

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
16 janvier 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/005038 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

G01N 33/68, 33/50, 33/94

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GOB-  
AILLE, Serge [FR/FR]; 3, rue du Climont, F-67550  
Vendenheim (FR). MAITRE, Michel [FR/FR]; 3, rue  
Saint Pierre le Jeune, F-67000 Strasbourg (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/02337

(22) Date de dépôt international : 4 juillet 2002 (04.07.2002)

(74) Mandataires : TEZIER HERMAN, Béatrice etc.;  
Becker et Associates, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris  
(FR).

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

0108937

5 juillet 2001 (05.07.2001) FR

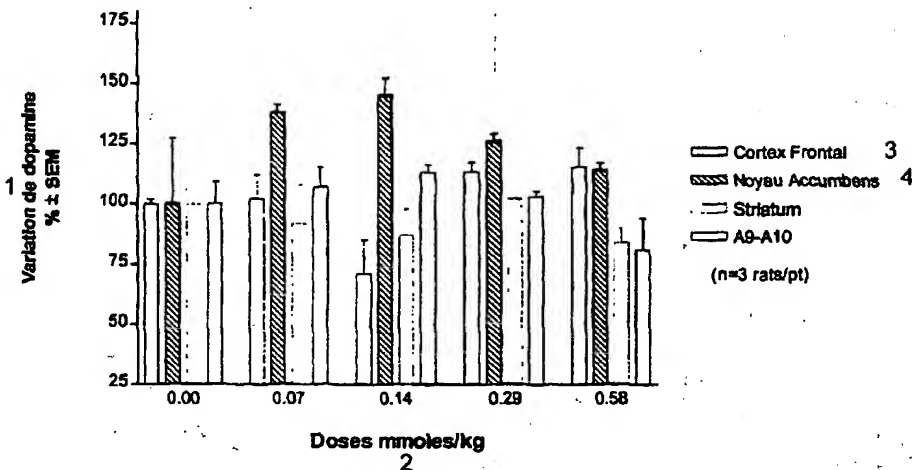
(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : UNI-  
VERSITE LOUIS PASTEUR [FR/FR]; 4, rue Blaise-Pas-  
cal, F-67000 Strasbourg (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: IDENTIFICATION OF MODULATORS OF NEUROTRANSMITTER ACTIVITY OF XANTHURENIC ACID

(54) Titre : IDENTIFICATION DE MODULATEURS DE L'ACTIVITE NEUROTRANSMETTEUR DE L'ACIDE XANTHURE-  
NIQUE



1 VARIATION OF DOPAMINE 3 FRONTAL CORTEX  
2 DOSES MMOLES/KG 4 NUCLEUS ACCUMBENS

(57) Abstract: The invention relates to methods and compositions for the selection and development of novel pharmacological agents or novel medicaments having properties or action mechanisms which are original. The invention specifically describes the characterization and identification of the functional role of several constitutive elements of the central nervous system playing a role in the metabolism or transport of xanthurenic acid (XA) or involved in receiving and/or transducing the signal mediated by said substance. Said targets are new tools for the definition and selection of novel synthetic chemical substances, interfering with said targets and modulating the functions of XA in order to benefit from the pharmacological or medicamentous advantages thereof. The invention can be primarily used to treat neurological or mental pathologies and diseases.

[Suite sur la page suivante]

WO 03/005038 A1



(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

**Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv) pour US seulement

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

---

(57) **Abrége :** La présente invention concerne des méthodes et compositions pour la sélection et le développement de nouveaux agents pharmacologiques ou de nouveaux médicaments possédant des propriétés ou des mécanismes d'action originaux. La présente invention décrit notamment la caractérisation et l'identification du rôle fonctionnel de plusieurs éléments constitutifs du système nerveux central, jouant un rôle dans le métabolisme ou le transport de l'acide xanthurenique (XA) ou impliqués dans la réception et/ou la transduction du signal médie par celie substance. Ces cibles sont de nouveaux outils pour la définition et la sélection de nouvelles substances chimiques de synthèse, interférant avec ces cibles et modulant les fonctions de XA pour en firer des profits sur le plan pharmacologique ou médicamenteux. Le domaine d'application de l'invention est, en premier lieu, le traitement d'affections et de maladies neurologiques ou mentales.

## IDENTIFICATION DE MODULATEURS DE L'ACTIVITE NEUROTRANSMETTEUR DE L'ACIDE XANTHURENIQUE

La présente invention concerne des méthodes et compositions pour la sélection et  
5 le développement de nouveaux agents pharmacologiques ou de nouveaux médicaments possédant des propriétés ou des mécanismes d'action originaux. La présente invention décrit notamment la caractérisation et l'identification du rôle fonctionnel de plusieurs éléments constitutifs du système nerveux central, jouant un rôle dans le métabolisme ou le transport de l'acide xanthurénique (XA) ou impliqués  
10 dans la réception et/ou la transduction du signal médié par cette substance. Ces cibles sont de nouveaux outils pour la définition et la sélection de nouvelles substances chimiques de synthèse, interférant avec ces cibles et modulant les fonctions de XA pour en tirer des profits sur le plan pharmacologique ou médicamenteux. Le domaine d'application de l'invention est, en premier lieu, le  
15 traitement d'affections et de maladies neurologiques ou mentales.

L'industrie pharmaceutique est à la recherche continue de nouvelles substances naturelles, présentes dans le cerveau, et dont le rôle fonctionnel est important pour la régulation et le contrôle de l'activité psychologique, psychoaffective, mentale,  
20 cognitive ou neurologique. La découverte de nouveaux mécanismes dans le domaine de la neurotransmission et de nouvelles cibles participant à ces mécanismes dans le système nerveux sont autant d'outils précieux pour la sélection de nouveaux médicaments dans des indications variées qui seront décrites plus loin. La présente invention décrit pour la première fois le rôle important d'une  
25 substance naturelle, l'acide xanthurénique, dans les phénomènes de neurotransmission au niveau central. Ce nouveau système de neurotransmission comporte un système métabolique de synthèse et d'élimination du transmetteur, des transporteurs, des récepteurs et des signaux intracellulaires allumés suite à la stimulation de ces récepteurs. Ces éléments constituent des "cibles" pouvant être  
30 modulées par des médicaments potentiels et utilisables pour l'identification, la

sélection ou la caractérisation de composés biologiquement actifs. D'autre part, l'invention décrit également différents rôles fonctionnels de l'acide xanthurénique dans le cerveau (interférences avec d'autres neurotransmetteurs, rôle dans certains protocoles comportementaux ou neuropharmacologiques) permettant d'envisager des domaines d'applications pharmacologiques et thérapeutiques nouveaux pour cette molécule, ses dérivés ou, plus généralement, les substances naturelles ou de synthèse fixées par les cibles décrites précédemment.

Depuis le début des années 1980, le catabolisme du tryptophane a progressivement occupé un rôle de plus en plus important dans les recherches des causes et des traitements de désordres majeurs au niveau du système nerveux central (Orv. Hetil 1992 Jul 19 ; 133 (29) : 1803 – 1807). Ce sont essentiellement des produits comme l'acide quinolinique et l'acide kynurénique, métabolites du tryptophane, qui ont focalisé l'attention pour leurs profils pharmacologiques. Un déséquilibre dans la formation de ces métabolites, une synthèse ou une dégradation chroniquement altérées, pourraient être responsables de troubles fonctionnels du système nerveux central et des pathologies qui en résulteraient.

S'agissant du XA, autre métabolite du tryptophane, différentes études ont rapporté des effets ponctuels du XA. Ainsi, un effet analgésique a été mentionné pour le XA (50 à 600 mg/kg i.p.) chez le rat Sprague-Dawley, par utilisation des tests de la « plaque chaude » et du « tail flick » (Pharmacol Res. 1998 oct ; 38 (4) : 243 – 250). D'autre part, chez l'animal, l'injection intrapéritonéale de XA a prolongé le temps de latence d'apparition des crises d'épilepsie induites par les injections intracérébroventriculaires d'acide quinolinique, de strychnine ou de pentylnetetrazole. Il semblerait que l'excrétion accrue de XA réponde à un processus de compensation chez les patients manifestant différents stades d'épisodes convulsifs (J. Neural. Transm. 1983 ; 56 (2-3) : 177-185 ; Clin. Endocrinol (Oxf) 1997 Dec ; 47 (6) : 667 – 677). Après ingestion de tryptophane (5g), l'excrétion urinaire (24h) de XA est nettement augmentée chez les patients

- déprimés (Psychopharmacology (Berl) 1981 ; 75 (4) : 346 – 349; Acta Psychiatr Belg 1979 Nov-Dec ; 79 (6) 638 – 646). D'autres résultats montrent cependant que l'injection ICV de XA, ne modifie pas le tracé EEG chez le rat (Okayama Igakkai Zasshi 104 (5-6) : 471 - 482 1992), que l'injection, chez la souris, de XA n'induit pas
- 5 de comportement de « head twitches » (Psychopharmacology (Berl) 1977 Mar 16 ;51 (3) : 305 – 309), que le XA ne bloque pas les dépolarisations induites par les acides aminés excitateurs (Brain Res. 1986 Aug. 20 ; 380 (2) : 297 – 302) et que le XA induit l'augmentation de l'expression d'une protéine chaperone du réticulum endoplasmique (Grp 94) et de calreticulin, provoquant une anomalie de
- 10 conformation de certaines protéines. Les concentrations d'acide xanthurénique nécessaires pour induire ces problèmes en culture de cellules seraient de l'ordre de plusieurs millimolaires (H. Malina; Biochemical and biophysical Research Communications, 265, 600-605 (1999)).
- 15 Toutefois, à ce jour, le rôle du XA demeure non caractérisé, son mode d'action et son rôle physiologique restent inconnus, l'existence d'un récepteur éventuel n'a pas été démontrée, et aucune stratégie thérapeutique basée sur cette molécule n'a été entreprise.
- 20 La présente invention résulte de la description, la caractérisation et l'identification du rôle fonctionnel de plusieurs éléments constitutifs du système nerveux central, jouant un rôle dans le métabolisme ou le transport de l'acide xanthurénique (XA) ou impliqués dans la réception et/ou la transduction du signal médié par cette substance. Ces cibles sont de nouveaux outils pour la définition et la sélection de
- 25 nouvelles substances chimiques de synthèse, interférant avec ces cibles et modulant les fonctions de XA pour en tirer des profits sur le plan pharmacologique ou médicamenteux. L'invention démontre plus particulièrement le rôle du XA dans le système nerveux central et son implication, en tant que neurotransmetteur, dans de multiples mécanismes physio-pathologiques. L'invention montre notamment :

- l'existence et les caractéristiques de la libération extracellulaire du XA dans le cortex,
- l'existence d'un site de liaison de haute affinité pour cette substance dans le cerveau, modulé par les dérivés adényliques (adénosine, ADP, ATP), les ions cuivre et zinc, et l'acide kynurénique et ses dérivés,
- l'existence d'interrelations fonctionnelles in vivo entre le XA et la dopamine cérébrale, permettant notamment de présenter un rôle pour les terminaisons XA du cortex frontal dans la régulation du système dopaminergique, en particulier via un impact sur les activités glutamatergiques et GABAergiques. Le XA provoque des stéréotypies doses-dépendantes, de nature dopaminergique, lorsqu'il est administré dans le noyau A<sub>10</sub>, ou dans le nucleus accumbens, le striatum, les ventricules latéraux. Ceci permet d'impliquer le système XA comme une cible importante pour des ligands des sites récepteurs correspondants, ces ligands régulant les activités glutamate / GABA / dopamine impliquées dans la production des symptômes schizophréniques. On peut donc prévoir que des ligands des récepteurs XA possèdent un intérêt important pour le traitement de certains symptômes psychotiques,
- l'induction d'effets électrophysiologiques par le XA en quantités micromolaires sur certaines conductances ioniques membranaires de cellules exprimant les récepteurs XA,
- la mise en évidence d'un transport actif sodium-dépendant de XA par des neurones en cultures. Cette fonction représente une nouvelle cible pour des analogues structuraux de XA, ou plus généralement pour des ligands synthétiques interférant avec ce système de transport. En effet, l'inhibition de ce système de transport peut avoir pour conséquence l'augmentation de la durée de vie du XA dans certains compartiments fonctionnels du cerveau, en particulier le compartiment

synaptique. Les inhibiteurs de ce transport peuvent donc représenter une nouvelle classe de substances possédant des effets bénéfiques dans plusieurs types de pathologies neurologiques ou mentales,

- 5                   - les réactions au stress aigu entraînent non seulement une libération extracellulaire de noradrénaline, mais également une forte libération de XA. La libération de cette dernière substance participe à la mise en place des réactions d'adaptation à ce stress. Les résultats indiquent donc que les ligands modulant l'activité du système XA peuvent avoir des effets utilisables chez l'homme pour la régulation des réactions au stress.
- 10                  - la capacité d'agonistes synthétiques de XA d'induire un effet électrophysiologique du type de XA sur les cellules NCB-20 et, en particulier, de moduler la dopamine cérébrale in vivo,
- 15                  - la capacité d'antagonistes du XA, tels le NCS-486, d'antagoniser les effets électrophysiologiques induits par le XA ou ses agonistes, et en particulier d'inhiber l'activité dopaminergique du XA in vivo, et
- 20                  - les effets neuropharmacologiques in vivo spécifiques du XA, en application locale ou en administration systémique, qui induit sédation, anxiolyse, des effets dopaminergiques (exploitables dans plusieurs domaines tels que addiction aux drogues, maladie de parkinson, schizophrénie, troubles de l'humeur, etc.), des effets antidépresseurs et des effets bénéfiques sur la mémoire et sur les interactions sociales.
- 25   La présente demande démontre ainsi que le XA, pour lequel aucun rôle fonctionnel n'était connu jusqu'a présent dans le CNS (pour « Central Nervous System » ou encore « Système Nerveux Central »), possède des propriétés largement en faveur d'un rôle de neurotransmetteur / neuromodulateur. Ce nouveau système de neurotransmission / neuromodulation représente un éventail de cibles potentielles
- 30   (enzymes de synthèse et de dégradation de XA, sites récepteurs, sites de transport,

sites de libération) pour des ligands ou composés, de synthèse ou d'origine naturelle, modulant l'activité de XA et représentant, de ce fait, des médicaments potentiels dans plusieurs domaines de la thérapeutique neurologique et mentale.

- 5 La présente demande a donc pour objet l'utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies du système nerveux. L'invention concerne également une méthode de traitement de pathologies du système nerveux, notamment central, comprenant l'administration à un sujet d'un composé modulant l'activité de l'acide
- 10 xanthurénique.

- Un aspect particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé modulant spécifiquement l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies du système nerveux, et dans une
- 15 méthode de traitement correspondante. Le composé est dit spécifique lorsqu'il module d'abord l'activité du XA (e.g., son transport, son métabolisme ou l'activité du/des récepteurs XA) sans affecter directement, en première intention, de façon significative l'activité d'autres systèmes de neurotransmission / neuromodulation centrale. Bien entendu, la modulation du système XA central entraîne des
- 20 répercussions et des adaptations dans d'autres systèmes, en particulier le système dopaminergique ou GABAergique, mais pas de manière substantielle dans le système sérotoninergique. Des composés spécifiques particuliers selon l'invention sont des composés capables de lier préférentiellement un récepteur XA sans lier, de manière spécifique ou substantielle, un récepteur sérotoninergique ou autre
- 25 récepteur d'autres neurotransmetteurs/neuromodulateurs.

Selon des variantes préférées de mise en œuvre, l'invention a plus particulièrement pour objet :

sites de libération) pour des ligands ou composés, de synthèse ou d'origine naturelle, modulant l'activité de XA et représentant, de ce fait, des médicaments potentiels dans plusieurs domaines de la thérapeutique neurologique et mentale.

- 5 La présente demande a donc pour objet l'utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies du système nerveux. L'invention concerne également une méthode de traitement de pathologies du système nerveux, notamment central, comprenant l'administration à un sujet d'un composé modulant l'activité de l'acide
- 10 xanthurénique.

- Un aspect particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé modulant spécifiquement l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies du système nerveux, et dans une
- 15 méthode de traitement correspondante. Le composé est dit spécifique lorsqu'il module d'abord l'activité du XA (e.g., son transport, son métabolisme ou l'activité du/des récepteurs XA) sans affecter directement, en première intention, de façon significative l'activité d'autres systèmes de neurotransmission / neuromodulation centrale. Bien entendu, la modulation du système XA central entraîne des
- 20 répercussions et des adaptations dans d'autres systèmes, en particulier le système dopaminergique ou GABAergique, mais pas de manière substantielle dans le système sérotoninergique. Des composés spécifiques particuliers selon l'invention sont des composés capables de lier préférentiellement un récepteur XA sans lier, de manière spécifique ou substantielle, un récepteur sérotoninergique ou autre
- 25 récepteur d'autres neurotransmetteurs/neuromodulateurs.

Selon des variantes préférées de mise en œuvre, l'invention a plus particulièrement pour objet :

- l'utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de l'anxiété, ainsi qu'une méthode de traitement correspondante ;
- 5 - l'utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de la dépression, ainsi qu'une méthode de traitement correspondante ;
- l'utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de troubles de la mémoire ou des interactions sociales, ainsi qu'une méthode de traitement correspondante ;
- 10 - l'utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament sédatif et/ou hypnotique, en particulier un composé qui potentialise l'effet neuropharmacologique de XA, de préférence un composé activateur allostérique du récepteur XA, ainsi qu'une méthode de traitement correspondante ;
- 15 - l'utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné à moduler l'action dopaminergique, ainsi qu'une méthode de traitement correspondante ;
- l'utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné à traiter des symptômes psychotiques, en particulier la schizophrénie, ainsi qu'une méthode de traitement correspondante ;
- 20 - l'utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné à réguler des réactions au stress, ainsi qu'une méthode de traitement correspondante ;
- 25 - l'utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné à réguler l'éveil comportemental, ainsi qu'une méthode de traitement correspondante ;

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, amélioration de la durée de vie, amélioration de la qualité de vie, ralentissement de la progression de la maladie), etc. Le traitement peut en outre  
5 être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements, notamment adressant les événements tardifs de la pathologie ou d'autres principes actifs. Comme indiqué ci-dessus, les composés utilisés sont préférentiellement des modulateurs spécifiques de l'activité XA.

10 L'invention a aussi pour objet un procédé pour moduler les effets dopaminergiques du XA comprenant l'administration à un sujet d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide  
15 xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de maladies neurodégénératives, notamment de la maladie de Parkinson, d'Alzheimer ou de l'ALS, ou de maladies mentales, telles que la schizophrénie, ou encore de la dépendance à certaines drogues, notamment aux opiacées.

20 L'invention concerne également un procédé pour moduler l'activité XA in vivo, comprenant l'administration à un sujet d'une quantité efficace d'un composé synthétique modulant l'activité XA.

Dans le contexte de la présente demande, le terme « modulation » désigne soit une  
25 stimulation, soit une inhibition de l'activité XA. La stimulation peut être obtenue par l'utilisation de composés mimant l'activité de XA ou stimulant la quantité ou l'efficacité de XA. L'inhibition peut être partielle (e.g., une réduction de l'activité). Elle peut être obtenue en diminuant la quantité de XA présente ou en inhibant la capacité de XA à produire un effet biologique, ou en bloquant ou inhibant l'effet  
30 biologique induit par XA.

De ce fait, au sens de la présente demande, le terme « activité de l'acide xanthurénique » désigne notamment la synthèse de ce composé, son transport, sa libération, son interaction avec un récepteur ou avec un partenaire, sa dégradation, un signal ou une voie métabolique activée ou régulée par XA, etc., c'est-à-dire l'activité du système utilisant le XA comme médiateur. Le composé modulant l'activité du XA peut donc être un agent modulant la synthèse du XA, un agent modulant le transport ou la libération du XA, un agoniste du XA, un antagoniste du XA, etc. Il peut s'agir également d'un composé modulant l'activité du site récepteur XA en agissant sur un site régulateur ou allostérique de ce récepteur.

Selon un premier mode particulier de réalisation, le composé utilisé est un composé modulant la synthèse ou la régulation du XA. Un tel composé peut agir sur l'activité ou l'expression d'enzymes impliqués dans la biosynthèse de cette molécule ou de ses précurseurs, en particulier un composé modulant l'activité de la kynurénine 3-hydroxylase. Cet enzyme participe à la régulation de la production de XA, et sa modulation par des composés permet de moduler l'activité du XA, au sens de la présente demande. Des composés modulant l'activité ou l'expression de cet enzyme sont par exemple des molécules antisens, des inhibiteurs transcriptionnels, des ribozymes ou aptazymes, des anticorps anti-protéine, des composés chimiques ou peptidiques capables d'inhiber l'activité de l'enzyme, etc.

Selon un autre mode particulier, le composé utilisé est un composé modulant la liaison de XA à un récepteur membranaire (e.g., un agoniste ou un antagoniste). Un agoniste est un composé présentant une affinité pour le site de liaison du XA, et produisant un signal analogue à celui produit par le XA. Un antagoniste est un composé présentant une affinité pour le site de liaison du XA, et empêchant la liaison et la production d'un signal par le XA ou un agoniste du XA. De tels composés peuvent être des analogues de XA, des anticorps anti-XA, des composés de synthèse, etc. Ainsi, un composé modulant la liaison de XA à un récepteur

membranaire permet d'impliquer le système XA comme une cible importante pour des ligands des sites récepteurs correspondants, ces ligands régulant les activités glutamate / GABA / dopamine impliquées dans la production des symptômes schizophréniques. Les ligands des récepteurs XA possèdent un intérêt particulier

5 pour le traitement de certains symptômes psychotiques. Les composés antagonistes du récepteur XA trouvent plus spécifiquement des applications dans la régulation de l'éveil comportemental et dans certaines pathologies mentales ou une hyperdopaminergie. De tels composés peuvent être identifiés, synthétisés, ou caractérisés par des méthodes décrites ci-après.

10

Un autre composé utilisable selon l'invention est un composé modulant le transport du XA ou sa libération. De tels composés permettent, en réduisant ou en facilitant la libération de XA, de moduler localement l'activité du XA, au sens de l'invention. D'autres molécules de synthèse, ayant dans certains cas des analogies structurales

15 avec XA, peuvent interférer avec son transport vésiculaires ou via des transporteurs de la membrane plasmique. En particulier, la mise en évidence d'un transport actif, sodium-dépendant de XA par des neurones en cultures représente une nouvelle cible pour des analogues structuraux de XA, ou plus généralement pour des ligands synthétiques interférant avec ce système de transport. En effet, l'inhibition de ce

20 système de transport a pour conséquence l'augmentation de la durée de vie du XA dans certains compartiments fonctionnels du cerveau, en particulier le compartiment synaptique. Les inhibiteurs de ce transport représentent ainsi une nouvelle classe de substances possédant des effets bénéfiques dans plusieurs types de pathologies neurologiques ou mentales.

25

Un autre composé utilisable selon l'invention est un composé modulant la synthèse, le transport ou l'activité du récepteur du XA. De tels composés permettent, en réduisant ou en facilitant l'exposition de récepteurs XA, de moduler localement l'activité de cette molécule.

30

## 11.

Les composés modulant l'activité du XA selon l'invention peuvent être de nature et d'origine variées. Il peut s'agir des produits inorganiques ou organiques et notamment d'un polypeptide (ou une protéine ou un peptide), d'un acide nucléique, d'un lipide, d'un polysaccharide, d'un composé chimique ou biologique, etc. Le composé peut être d'origine naturelle ou synthétique et issu notamment d'une banque combinatoire. De préférence, ces composés sont des dérivés de l'acide xanthurénique ou de l'acide kynurénique.

Les composés ou compositions selon l'invention peuvent être administrés de différentes manières et sous différentes formes. Ainsi, ils peuvent être injectés par voie systémique ou orale, de préférence systémique, comme par exemple par voie intraveineuse, intra-musculaire, sous-cutanée, trans-dermique, intra-artérielle, intracérébrale, intra-péritonéale, intracérébrovasculaire, etc. Pour les injections, les composés sont généralement conditionnés sous forme de suspensions liquides, qui peuvent être injectées au moyen de seringues ou de perfusions, par exemple. A cet égard, les composés sont généralement dissous dans des solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec un usage pharmaceutique et connues de l'homme du métier. Ainsi, les compositions peuvent contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, stabilisants, conservateurs, etc. Des agents ou véhicules utilisables dans des formulations liquides et/ou injectables sont notamment la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, le polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales, l'acacia, etc. Les composés peuvent également être administrés sous forme de gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de formulation, on utilise avantageusement un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des amidons.

Il est entendu que le débit et/ou la dose injectée peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du patient, de la pathologie, du mode d'administration, etc. Typiquement, les composés sont administrés à des doses pouvant varier entre 0.1 µg et 1000 mg/kg de poids corporel, plus généralement de 0,01 à 500 mg/kg, typiquement entre 1 et 200 mg/kg. En outre, des injections répétées peuvent être réalisées, le cas échéant. D'autre part, pour des traitements chroniques, des systèmes retard ou prolongés peuvent être avantageux.

A titre indicatif, les résultats présentés dans les exemples montrent que le XA exerce un effet sédatif lorsqu'il est administré chez l'animal à des doses supérieures à environ 50 mg/kg. Les doses préférées pour obtenir un effet anxiolytique chez l'animal sont des doses inférieures à 50 mg/kg. Un effet anti-dépresseur est avantageusement obtenu chez l'animal à des doses comprises entre 100 et 200 mg/kg.

L'invention concerne également des méthodes pour identifier, sélectionner ou caractériser des composés biologiquement actifs, notamment de composés actifs sur le système nerveux, lesdites méthodes étant basées sur la modulation de l'activité du XA. Les méthodes de l'invention peuvent comprendre des tests de liaison in vitro, des tests de liaison en système cellulaire (ou sur des préparations membranaires, naturelles ou synthétiques) ou des tests fonctionnels en système cellulaire ou artificiels.

Selon un mode particulier, une méthode de sélection, identification ou caractérisation de composés selon l'invention comprend la mise en contact d'un composé test avec une cellule (ou une préparation membranaire naturelle ou synthétique) exprimant une molécule cible impliquée dans l'activité de à l'acide xanthurénique, et la mise en évidence d'une liaison du composé test à ladite molécule.

- La molécule cible peut être le récepteur du XA, une enzyme de synthèse du XA, un transporteur du XA, etc., ou tout fragment de ceux-ci. Dans un exemple particulier, la molécule cible est le récepteur au XA ou un fragment de celui-ci, notamment un fragment conservant la capacité de liaison au XA, comme par exemple un fragment
- 5 extracellulaire. Dans un autre mode de réalisation, la molécule cible est une enzyme de biosynthèse ou de régulation du XA, comme par exemple la kynurénine 3-hydroxylase. Une cible moléculaire préférée est représentée par le récepteur au XA ou des fragments de celui-ci.
- 10 La liaison du composé test à la molécule cible peut être mise en évidence par exemple en utilisant un composé test marqué ou en utilisant un ligand marqué de la cible moléculaire (par exemple un ligand marqué du récepteur XA ou un anticorps marqué spécifique d'une enzyme de synthèse du XA ou d'un transporteur du XA), le déplacement de la liaison du ligand marqué reflétant la liaison du composé test. Le
- 15 ligand marqué peut être tout produit liant la molécule cible (anticorps, agoniste ou antagoniste, fragment ou dérivé d'un ligand endogène, etc.). Le ligand peut être marqué par toute technique connue de l'homme du métier, notamment par incorporation d'un élément radioactif, fluorescent, luminescent, enzymatique, colorimétrique, etc.
- 20 Dans un mode de réalisation particulier, le ligand est un anticorps marqué, spécifique de la cible moléculaire considérée. L'anticorps peut être polyclonal ou monoclonal. Il peut également s'agir d'un fragment ou dérivé d'anticorps, comme par exemple des fragments Fab, Fab'2, CDR, etc. Les anticorps peuvent être
- 25 produits de manière conventionnelle, par immunisation la cible moléculaire (ou une partie immunogène de celle-ci), et récupération du sérum (polyclonal) ou des cellules de la rate (pour fabriquer des hybridomes par fusion avec une lignée appropriée), comme décrit par exemple dans Vaitukaitis et al. (J Clin Endocrinol Metab. 1971, 33(6), 988-91) ou dans Harlow et al. (Antibodies: A laboratory Manual,

CSH Press, 1988). Les fragments Fab ou F(ab')<sub>2</sub> peuvent être produits par exemple selon Riechmann et al., 1988, Nature 332, 323-327.

5 Dans un autre mode de réalisation particulier, la cible moléculaire est le récepteur du XA et le ligand est un ligand endogène, un agoniste ou un antagoniste du récepteur, marqué. Dans un mode de mise en œuvre spécifique, on utilise du XA marqué, notamment radiomarké, en particulier tritié.

10 Selon un mode particulier, la méthode comprend donc la mise en contact d'un composé test avec une cellule (ou une préparation membranaire naturelle ou synthétique) exprimant un récepteur à l'acide xanthurénique et la mise en évidence d'une liaison du composé test au récepteur.

15 Selon un autre mode particulier, la méthode comprend la mise en contact d'un composé test avec une cellule (ou une préparation membranaire naturelle ou synthétique) exprimant une molécule cible impliquée dans l'activité de l'acide xanthurénique, en présence d'un ligand marqué de ladite cible, et la mise en évidence d'une liaison du composé test par détermination du déplacement de la liaison du ligand marqué.

20

Dans une autre variante, le procédé de l'invention comprend la mise en contact d'un composé test avec une cellule exprimant une molécule cible impliquée dans l'activité de l'acide xanthurénique (en particulier le récepteur de l'acide xanthurénique), et la mise en évidence d'un effet biologique ou pharmacologique caractéristique d'une liaison du composé test à ladite molécule cible. L'effet biologique ou pharmacologique peut être l'expression d'une ou plusieurs protéines cellulaires, l'expression d'un récepteur, l'activation d'un gène, l'internalisation du récepteur, l'apparition d'un courant électrique, d'un flux ou d'un influx d'ions, etc. La mise en évidence de cet effet peut être réalisée par tous moyens appropriés,

25

comme la mesure de l'expression d'un gène rapporteur, la mesure de l'expression membranaire d'un récepteur, le dosage des ions ou d'un courant électrique, etc.

- Classiquement, l'effet du composé test est comparé à l'effet déterminé en l'absence dudit composé. En outre, l'effet du composé test peut être déterminé en présence d'un ligand du récepteur XA, par exemple du XA lui-même, notamment lorsqu'une activité de modulation ou d'inhibition de XA est recherchée.
- 5
- 10 Selon une variante particulière, le procédé de l'invention comprend donc la mise en contact d'un composé test avec une cellule exprimant un récepteur à l'acide xanthurénique, en présence d'un ligand dudit récepteur, la mesure d'un effet biologique ou pharmacologique caractéristique d'une liaison au récepteur XA et la comparaison de l'effet mesuré à celui obtenu en l'absence de composé test.
- 15 Un tel procédé est particulièrement adapté à la recherche, la sélection, la caractérisation ou l'amélioration de composés inhibant l'activité de XA.

- Les cellules utilisées dans les tests peuvent être toutes cellules exprimant une molécule cible impliquée dans l'activité du XA, notamment un récepteur XA. Il peut s'agir de cellules exprimant naturellement cette molécule (e.g., ce récepteur), ou de cellules modifiées génétiquement ou traitées pour sur-exprimer ladite molécule (e.g., ledit récepteur). Il s'agit, dans un mode préféré de l'invention, de cellules de mammifères (cellules nerveuses, hépatocytes, fibroblastes, cellules endothéliales, musculaires, etc.). De manière encore plus
- 20
- 25 préférée, ces cellules sont des cellules humaines. Il peut également s'agir de cultures primaires ou de lignées établies. Dans un autre mode de mise en oeuvre, il est possible également d'utiliser des cellules procaryotes (bactéries), des cellules de levure (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, etc.), des cellules végétales, etc.

Dans un mode préféré, on utilise des cellules d'origine nerveuse ou synaptique, notamment des neurones, des cellules gliales, des astrocytes, du matériel d'origine synaptique (membranes, synaptosomes, synaptoneurosomes), etc. Ces cellules peuvent être isolées, cultivées et caractérisées selon des techniques connues, décrites dans les exemples.

La présente demande montre, pour la première fois, l'existence d'un récepteur de haute affinité pour le XA exprimé dans différentes populations cellulaires ou régions du cerveau. Ce récepteur présente les caractéristiques pharmacologiques suivantes :

- expression dans le cerveau,
- $K_d$  du récepteur synaptique pour le XA inférieur ou égal à environ 300 nM à 1300 nM,
- récepteur modulé par les dérivés adényliques (adénosine, ADP, ATP)
- récepteur modulé par les ions cuivre et zinc,
- récepteur modulé par l'acide kynurénique,
- l'activation du récepteur par le XA induit un courant électrique,
- le récepteur est exprimé par les cellules NCB-20.

20

Par ailleurs, des indications électrophysiologiques et biochimiques laissent prévoir un récepteur couplé à des G protéines, sans que cela ait été formellement démontré.

25 La caractérisation de ce récepteur, son identification et la description de procédés permettant de mesurer la liaison de molécules sur ce récepteur permettent, selon la présente demande, de mettre en évidence de nouveaux composés biologiquement actifs, capables de moduler l'activité du XA. La démonstration du rôle pharmacologique de XA souligne l'importance de la mise à disposition de tels composés actifs.

30

Dans un mode particulier, pour la mise en œuvre des procédés ci-dessus, on utilise une préparation membranaire exprimant un récepteur du XA. La préparation membranaire peut être, avantageusement, d'origine naturelle, c'est-à-dire produite à partir d'une cellule exprimant le récepteur. On peut produire des préparations membranaires par lyse mécanique, chimique, physique, électrique, etc., et notamment par traitement avec des détergents, ultrasons, congélation/décongélation, etc., comme illustré dans les exemples. Cette préparation membranaire se caractérise essentiellement par la présence de fragments de membrane, comprenant une bicouche lipidique dans laquelle tout ou partie du récepteur XA est présente. Ces préparations membranaires sont généralement dépourvues de cellule intacte. En outre, elles peuvent être enrichies en débris membranaires par des traitements appropriés (centrifugation, etc.). On peut également utiliser une préparation membranaire d'origine synthétique, comme par exemple un liposome dans lequel tout ou partie du récepteur XA a été introduit, ou une membrane supportée.

Pour les tests de liaison ou fonctionnels ci-dessus, les composés peuvent être mis au contact des cellules (ou des préparations membranaires) à différents moments, selon leur(s) effet(s), leur concentration ou la nature des cellules et pour des périodes variées, qui peuvent être ajustées par l'homme du métier. Le test peut être effectué sur tout support approprié et notamment sur une plaque, une lame, une boîte, dans un tube ou une flasque. Généralement, la mise en contact est réalisée dans une plaque multi-puits ce qui permet de conduire, en parallèle, des essais nombreux et variés. Parmi les supports typiques on trouve des plaques de microtitration et plus particulièrement des plaques 96 ou 384 puits (ou plus), faciles à manipuler.

Selon le support et la nature du composé test, des quantités variables de cellules peuvent être utilisées lors de la mise en œuvre des méthodes décrites.

De manière classique,  $10^2$  à  $10^6$  cellules sont mises en contact avec un type de composé test, dans un milieu de culture approprié, et de manière préférentielle entre  $10^3$  et  $10^5$  cellules. Lorsqu'une préparation membranaire est utilisée, on applique généralement 0,01 à 50 mg de protéine par essai, plus  
5 préférentiellement de 0,05 à 2 mg de protéine par essai. Les essais peuvent être réalisés dans tout type de milieu approprié, comme par exemple des solutions salines, des tampons, etc. On peut citer notamment des tampons Tris, Pipes, Hepes, etc. La température est, typiquement, proche de la température ambiante. Le pH du milieu est avantageusement compris entre 5,5 et 8, plus  
10 préférentiellement entre 7 et 8. Il est entendu que ces paramètres peuvent être ajusté par l'homme du métier, suivant les indications fournies dans les exemples.

La quantité (ou la concentration) de composé test peut également être ajustée  
15 par l'utilisateur selon le type de composé (sa toxicité, sa capacité de pénétration cellulaire, etc.), la longueur de la période d'incubation, etc. Généralement, les cellules (ou membranes) sont exposées à des quantités de composés test qui varient de 1nM à 1mM. Il est bien sûr possible de tester d'autres concentrations sans dévier de la présente invention. Chaque composé peut, de plus, être testé,  
20 en parallèle, à différentes concentrations et sur différentes périodes. Par ailleurs, des adjuvants et/ou vecteurs et/ou produits facilitant la pénétration des composés dans les cellules tels que des liposomes, des lipides cationiques, des polymères, des peptides issus de virus, etc., peuvent, en outre, être utilisés, si nécessaire. Le contact peut être maintenu pendant une période comprise entre  
25 1 minute et plusieurs heures, selon la nature de la molécule cible. Lorsque la molécule cible est le récepteur XA, le contact est maintenu typiquement pendant moins de 1 heure environ. Lorsque la molécule cible est une molécule intracellulaire, le contact peut être maintenu plus longtemps.

30 Dans une autre variante, l'invention est basée sur des tests de liaison in vitro

entre le XA et un composé test ou entre un composé test et une molécule cible (par exemple tout ou une partie du récepteur XA). Selon ces modes de mise en œuvre, le procédé pour la sélection, l'identification ou la caractérisation de composés actifs comprend:

- 5       - la mise en contact d'un composé test avec une molécule cible impliquée dans l'activité du XA, par exemple une enzyme de synthèse ou de régulation, un transporteur, un récepteur, ou un fragment de ceux-ci, et
- la détermination de la liaison éventuelle dudit composé test sur ladite molécule.

10

La liaison du composé test peut être mise en évidence de différentes manières, comme par exemple par migration sur gel ou électrophorèse des complexes formés. D'autres méthodes basées sur la luminescence ou utilisant la technique FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) bien connue de l'homme du

15       métier ou la technique SPA (« Scintillation Proximity Assay »), peuvent être mises en œuvre, dans le cadre de la présente invention, pour déterminer la liaison éventuelle du composé test sur la molécule cible. Lorsque la cible est un récepteur, la mesure de la liaison peut être effectuée en présence d'un ligand marqué, par détermination de la déplacement du ligand par le composé test.

20

La présente invention peut être appliquée à tout type de composé test. Ainsi, le composé test peut être tout produit qui se présente sous une forme isolée ou en mélange avec d'autres produits. Le composé peut être défini en termes de structure et/ou de composition ou ne pas être défini. Le composé peut, par

25       exemple, être un produit isolé et structurellement défini, un produit isolé de structure indéfinie, un mélange de produits connus et caractérisés ou une composition indéfinie comprenant un ou plusieurs produits. De telles compositions indéfinies peuvent être, par exemple, des échantillons de tissus, des fluides biologiques, des surnageants cellulaires, des préparations

30       végétales, etc. Les composés test peuvent être des produits inorganiques ou

organiques et notamment un polypeptide (ou une protéine ou un peptide), un acide nucléique, un lipide, un polysaccharide, un composé chimique ou biologique tel qu'un facteur nucléaire, un cofacteur ou tout mélange ou dérivé de ces derniers. Le composé peut être d'origine naturelle ou synthétique et

5 inclure une banque combinatoire, un clone ou une banque de clones d'acides nucléiques exprimant un ou plusieurs polypeptide(s) liant l'ADN, etc.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'un composé actif, notamment sur le système nerveux, le procédé comprenant :

- 10
- la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'activité de XA in vitro ou ex vivo, et
  - la synthèse dudit composé ou d'un analogue structural de celui-ci.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'un modulateur de XA, le procédé comprenant :

- 15
- la mise en contact d'un composé avec une molécule cible impliquée dans l'activation du XA,
  - la détermination d'un effet du composé sur la molécule cible, ledit effet indiquant que le composé est un modulateur de XA, et
- 20
- la synthèse dudit composé ou d'un analogue structural de celui-ci.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'un médicament comprenant un composé actif, notamment sur le système nerveux, le procédé comprenant :

- 25
- la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'activité de XA in vitro ou ex vivo, et
  - le mélange dudit composé ou d'un analogue structural de celui-ci avec un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé de production d'un médicament comprenant un composé modulateur de XA, le procédé comprenant :

- la mise en contact d'un composé avec une molécule cible impliquée dans l'activation du XA,
  - 5       - la détermination d'un effet du composé sur la molécule cible, ledit effet indiquant que le composé est un modulateur de XA, et
  - le mélange dudit composé ou d'un analogue structural de celui-ci avec un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.
- 10    Dans le contexte de l'invention, le terme « analogue structural » désigne toute molécule obtenue par modélisation moléculaire ou variation structurale à partir d'un composé test.

D'autres avantages et aspects de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples  
15    qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

#### LEGENDE DES FIGURES

20    **Figure 1** : Concentration extracellulaire de XA au niveau du Cortex préfrontal (CPF)

**Figure 2A et 2B** : Libération de XA dans le CPF après stimulation électrique du VTA (figure 2A = 100  $\mu$ A ; figure 2B = 200  $\mu$ A). Dopamine = triangles noirs ; XA = carrés noirs

25    **Figure 3** : Libération de XA induite par 100 mM KCl dans la sonde pendant 5 min.

**Figure 4** : Libération de XA induite par la présence de 50  $\mu$ M de veratridine dans la sonde pendant 20 minutes.

**Figure 5** : Libération de XA dans le CPF sous stimulation électrique (barres blanches). La même expérience, reproduite en l'absence d'ions calcium et

en présence d'EGTA, ne montre plus de libération accrue de XA sous stimulation électrique (barres noires).

5 **Figure 6 :** Libération de XA dans le CPF après stimulation électrique du VTA (barres blanches, libération de base = 21 pmol / 5 min). Même expérience mais en présence de 2.0  $\mu$ M de TTX dans le liquide de dialyse (barres noires, libération de base = 7 pmol / 5 min). En présence de TTX, il n'existe plus de libération induite de XA.

10 **Figure 7 :** Répartition de XA dans le cerveau de rat dans les conditions physiologiques. Concentrations selon un code couleur arbitraire. Abréviations : CxPrFr : cortex préfrontal ; CxFR : cortex frontal ; CxPar : cortex pariétal ; CxOcc : cortex occipital ; C : cervelet ; GP : globus pallidus ; CP : caudé putamen ; n.Acc : noyau accumbens ; TO : tubercules olfactifs ; BO : bulbes olfactifs ; S : septum ; Hb : habenula ; Hi : hippocampe ; Th : thalamus ; Hy : hypothalamus ; SN : substance noire (A9) ; VTA : aire tegmentale ventrale (A10) ; Rad : noyau raphé dorsal ; Ram : noyau raphé médian ; LC : locus coeruleus (A6) ; MO : médulla oblongata.

15

**Figure 8 :** Effet du pH sur la liaison de l'AX sur son (ses) site(s) de liaison

**Figure 9 :** Etude de la linéarité du binding spécifique en fonction de la concentration en protéine.

20 **Figure 10 :** Détermination de la constante d'association  $K_{on}$

**Figure 11 :** Détermination de la constante de dissociation  $K_{off}$

**Figure 12 :** Courbe de saturation des sites membranaires de XA. Détermination du  $K_d$  et du  $B_{max}$ .

**Figure 13 :** Inhibition compétitive de la fixation de XA radioactif par XA non marqué. Détermination des IC 50 pour l'acide xanthurénique

25

**Figure 14 :** Influence d'ions métalliques sur la liaison de l'acide xanthurénique à son (ses) site(s) de liaison

**Figure 15 :** Effet de la variation du pH sur la liaison de l'AX à son (ses) site(s) de liaison en présence d'ions cuivre.

**Figure 16 :** Etude de la linéarité du binding spécifique en fonction de la concentration protéique en présence d'ions cuivre

**Figure 17 :** Effet/dose du Cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) sur la liaison de l'AX à son (ses) site(s) de liaison

5 **Figure 18 :** Mesure de la courbe de saturation et des paramètres  $K_d$  et  $B_{\text{max}}$  en présence d'ions cuivre.

**Figure 19 :** Inhibition compétitive de XA marqué par XA non radioactif. Détermination des  $\text{IC}_{50}$  pour l'acide xanthurénique.

10 **Figure 20 :** Dose / effet du XA sur la réponse dopaminergique après injection locale dans le CPF.

**Figure 21 :** Evolution des taux de dopamine, DOPAC et HVA dans le CPF après application locale de  $20 \mu\text{M}$  de XA.

15 **Figure 22 :** Effets de la présence de l'antagoniste NCS-486 sur la libération extracellulaire de dopamine après application locale de  $20 \mu\text{M}$  de XA dans le CPF.

**Figure 23 :** Stratégie expérimentale dans les expériences de patch-clamp.

**Figure 24 :** Effet de l'acide xanthurénique sur les cellules NCB-20.

20 A. Traces types enregistrées à partir d'un fragment de membrane en conditions contrôle et pendant l'application de l'acide xanthurénique à une concentration de  $20 \mu\text{M}$ . Le fragment de membrane était stimulé par une rampe de potentiel comme indiqué par le protocole illustré par la trace du bas. En présence de l'acide xanthurénique un grand courant sortant se développe aux potentiels positifs. La trace a été numérisée à une fréquence de 2 kHz.

25 B. Evolution du courant sortant moyen mesuré à un potentiel de 95 mV.

En présence de l'acide Xanthurénique ce courant est augmenté de manière considérable.

C. Relation courant-potentiel du courant active en présence de l'acide xanthurénique (après soustraction du courant obtenu en condition contrôle).

La courbe en trait continu est l'ajustement du modèle de Boltzmann à ce courant.

**FIGURE 25.** Pharmacologie de la réponse à l'acide xanthurénique.

5 Le courant membranaire mesuré aux potentiels de  $-80$  et  $80$  mV est représenté en fonction du temps d'enregistrement. La période d'application des ligands du récepteur du xanthurénate est matérialisé par les traits pleins : en haut et en bas respectivement pour le NCS-482 et le NCS-486 seuls et au milieu pour le mélange des deux aux concentrations indiquées. Le NCS-482 et le NCS-486 sont des dérivés de l'acide xanthurénique.

10 Le NCS-486 seul ne change pas l'amplitude du courant.

**Figure 26 :** Activation d'une conductance chlorure par le récepteur de l'acide xanthurénique. L'agoniste utilisé dans cette expérience est le NCS-482 à une concentration de  $20 \mu\text{M}$ . La réponse se développe en deux phases (a et b). Le nature du courant dans ces deux phases est différentes comme le

15 montre le potentiel d'inversion du courant obtenu dans chacune des deux phases (diagrammes du bas).

**Figure 27 :** Activité locomotrice spontanée des animaux traités par des doses croissantes de XA. Le temps est mesuré en minutes.

**Figure 28 :** Mesure de la réactivité globale de l'animal dans le test de l'open field.

20 Le XA à la dose de  $37,5 \text{ mg / kg}$  (dose non sédatrice) favorise le déplacement de l'animal au centre du champ ouvert éclairé par rapport aux animaux contrôles.

**Figure 29 :** Effet / dose du XA dans le test de Porsolt (test de la nage). La durée d'immobilité décroît avec l'augmentation de la dose de XA. Les rats traités à

25 l'imipramine  $30 \text{ mg / kg}$  servent de références positives.

**Figure 30 :** Dans l'open field, une dose de XA de  $50 \text{ mg / kg}$  induit une augmentation de la durée des interactions sociales par rapport à l'animal non traité. Ce résultat est également en faveur d'un effet anxiolytique du XA.

**Figure 31 :** Effet de XA sur les processus de mémorisation dans le test de reconnaissance d'objets.

**Figure 32 :** Cinétique du transport de XA (ND-1089) dans les cellules NCB-20. La vitesse optimum du transport est atteinte après environ 1 minute.

- 5 **Figure 33 :** Transport de XA (ND-1089) dans les cellules NCB-20 en fonction de la concentration en [ $^3\text{H}$ ]XA. La représentation de Scatchard permet de déterminer les paramètres mathématiques du transport intracellulaire du ND-1089 soit un Km de 105  $\mu\text{M}$  et une Vmax de 1229 pmoles/mg protéine/minute.
- 10 **Figure 34 :** histogramme exprimé en pourcentage de capture par référence au transport en présence de XA radioactif seul (=100 %).
- Figure 35 :** libération extracellulaire frontale après rétrodialyse de XA 20 M pendant 20 minutes exprimée en concentration de dopamine (% du basal) par rapport au temps (minutes) dans les dialysats
- 15 **Figure 36 :** libération extracellulaire frontale après rétrodialyse de XA 20 M pendant 20 minutes exprimée en concentration de glutamate (% du basal) par rapport au temps (minutes) dans les dialysats
- Figure 37 :** libération extracellulaire frontale après rétrodialyse de XA 20 M pendant 20 minutes exprimée en concentration de glutamate (% du basal) par rapport au temps (minutes)
- 20 **Figure 38 :** Actographie obtenue avec administration d'un ligand se fixant sur le site allostérique pour l'acide kynurénique, partie intégrante du site récepteur de XA qui est un dérivé de l'acide xanthurénique, intitulé ND-7000, à 100 mg / kg per os (PO)
- 25 **Figure 39 :** Effet dose/réponse après administration (P.O.) d'un ligand agoniste du récepteur XA, dérivé de l'acide xanthurénique, intitulé ND-1301, sur la dopamine tissulaire dans différentes régions cérébrales

## SECTION EXPERIMENTALE

5

### 1. MISE EN EVIDENCE ET PROPRIETES DE LA LIBERATION EXTRACELLULAIRE D'ACIDE XANTHURENIQUE (XA) IN VIVO DANS LE CORTEX PREFRONTAL DU RAT.

- 10 En combinant la stimulation électrique de l'aire tegmentaire ventrale (A10) et la microdialyse in vivo du cortex préfrontal chez le rat, une libération extracellulaire de XA a pu être mise en évidence. Cette libération peut-être reproduite par dépolarisation locale à l'aide de fortes concentrations d'ions potassium ou de quantités micromolaires de veratridine. La libération de XA est calcium-dépendante et est bloquée par la tétradotoxine qui empêche la dépolarisation neuronale locale.
- 15 Le XA est donc libéré dans cette région du cerveau au moins, selon des caractéristiques identiques à celles des autres neurotransmetteurs connus, c'est à dire selon un mécanisme exocytotique induit par la dépolarisation neuronale.

20

## Matériels et Méthodes

### • Animaux

- Des rats males Wistar pesant 350 à 400 g ont été utilisés pour les expériences. Les animaux sont placés en cage individuelle de plastique et soumis à un cycle lumière/obscurité de 7 heures/ 19 heures et 19 heures/7 heures. L'accès à la nourriture et à l'eau est libre. Les interventions sur les animaux ont été menées dans la stricte application des règles de la directive européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC).

30

- **Procédure Chirurgicale**

Les expériences ont été réalisées à l'aide de canule en I, avec une extrémité de 4 mm. La membrane de dialyse (500  $\mu$ m) est en polycarbonate-polyether avec un seuil d'arrêt de 20 Kda. La membrane de dialyse est insérée dans le cortex préfrontal (CPF) tandis qu'une des extrémités de l'électrode de stimulation bipolaire est placée dans CPF et l'autre dans le VTA. L'intervention est réalisée sous anesthésie à la kétamine.

10

- **Protocole de Microdialyse**

Les expériences sont réalisées chez l'animal conscient, 24 à 72 heures après l'intervention chirurgicale. La composition du milieu de perfusion est la suivante : 147 mM NaCl, 1.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , et 4.0 mM KCl, pH 6.5. Dans le cas des stimulations à fortes concentrations de potassium, les ions sodium sont diminués de la même valeur. Dans le cas des stimulations en l'absence d'ions calcium, 2.0 mM EGTA sont rajoutés dans le milieu de dialyse. Les dialysats sont collectés à une vitesse de 2  $\mu$ l/min, toutes les 5 minutes et sont immédiatement stockés dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse.

20

- **Analyse de la dopamine et de l'acide xanthurénique**

Ces deux composés sont quantifiés par chromatographie HPLC avec détection électrochimique. Le système chromatographique consiste en une colonne 25 cm X 4.6 mm Hypersyl C18, maintenue à température constante. La phase mobile est un tampon 0.05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 0.1 mM EDTA et 6% méthanol. L'identification des pics s'effectue par comparaison avec les temps de rétention mesurés avec des solutions standards de calibration.

30

- **Protocole de stimulation électrique**

Le VTA a été stimulé pendant une période de 10 minutes, avec des trains de 30  
5 impulsions de durée 0,5 msec pendant 100 millisecc, d'intensité 100 ou de 200  $\mu$ A et à une fréquence de 25 Hz.

- **Détermination des rendements in vitro**

10 Ces déterminations sont destinées à estimer le passage de la dopamine et de XA au travers de la membrane de dialyse pendant les expériences in vivo. Les rendements de dialyse in vitro ont respectivement été d'environ 28% et d'environ 15% pour respectivement XA et la dopamine pour une vitesse de dialyse de 1  
15  $\mu$ l/min à température ambiante.

## Résultats

- **Détermination des concentrations de XA dans le milieu extracellulaire du CPF**

20

Ces études ont été réalisées en déterminant les taux variables de XA dialysés à différents rendements de dialyse. Les divers rendements de dialyse ont été modifiés par le changement graduel de la vitesse du liquide de dialyse (respectivement 1,2,3 et 4  $\mu$ l / minute) et détermination à chaque fois de la concentration de XA. Par  
25 extrapolation à vitesse zéro, on a un rendement de 100 % et une valeur de la concentration de XA dans le liquide de dialyse égal à sa concentration dans le milieu extracellulaire. L'expérience, menée sur 3 différents rats, a donné une valeur de XA = 6.1 pmol/ $\mu$ l de liquide de dialyse ou de milieu extracellulaire cérébral. Ce qui donne une valeur moyenne de 6.1  $\mu$ M de XA dans le milieu extracellulaire du  
30 CPF (figure 1).

- **Libération de XA dans le CPF après stimulation électrique.**

Dans deux séries d'expériences, les stimulations électriques ont été de 100 ou 200  $\mu$ A, pendant 10 minutes. Après insertion de la sonde et une heure de dialyse, la ligne de base a été établie par dialyse durant la deuxième heure (16 à 18 pmol/5 min). Une stimulation à 100 ou 200  $\mu$ A a donné le même résultat, indiquant que la totalité du compartiment libérable dans nos conditions, avait été libéré. Par rapport à une ligne de base arbitrairement fixée à 100%, la libération électriquement induite de XA atteint 539% alors que la libération de dopamine atteint 655%. La libération s'installe dès la stimulation, atteint un maximum après environ 5 minutes de stimulation, puis revient à la ligne de base, même si la stimulation se poursuit. Une cinétique plus précise ne peut être décrite, compte tenu des conditions de dialyse (prélèvements toutes les 5 minutes). Les résultats sont présentés sur la figure 2.

- **Libération de XA dans le CPF après dépolarisation locale par de fortes concentrations d'ions potassium ou par 50  $\mu$ M de veratrine.**

La libération de XA dans l'espace extracellulaire du CPF a été également testée après dépolarisation locale par de fortes concentrations d'ions potassium placés dans la sonde de dialyse (100 mM de KCl pendant 5 minutes). Avant stimulation, la libération de base était d'environ 92 pmol / 20 min. Après la dépolarisation, la libération de XA augmente progressivement pour atteindre 250% du niveau de base après 40 minutes. Puis, le niveau de base se rétablit progressivement et rejoint les niveaux antérieurs 80 minutes après la dépolarisation (figure 3).

Dans le cas de la veratrine, celle-ci a été placée dans la sonde à la concentration de 50  $\mu$ M pendant 20 minutes. Le niveau XA de base (avant la dépolarisation) était d'environ 96 pmol / 20 minutes. Après application de la veratrine, un pic de XA est rapidement libéré, atteignant environ 600% du niveau de base au bout de 20

minutes, puis le niveau de base antérieur est progressivement rétabli en 60 minutes environ (figure 4).

- **La libération de XA induite dans le CPF par la stimulation électrique est un phénomène calcium-dépendant**

Dans ces études, un groupe de rat est soumis à une stimulation électrique dans le VTA et on mesure la libération de XA dans le cortex frontal. La ligne de base est à 19 pmol/5 min et après stimulation électrique, la libération est à 70-75 pmol de XA pour 5 min de dialyse. La même expérience est refaite, mais dans ce cas le milieu de dialyse ne contient pas d'ions calcium, mais 2.0 mM EGTA. Dans ces conditions, la libération de base de XA est de 10 pmol / 5 min et la stimulation électrique ne produit aucun accroissement de la libération de XA (figure 5).

- **La libération de XA dans le CPF après stimulation électrique est inhibée par la tétródotoxine, bloqueur des canaux sodiques sodium-dépendant.**

L'étude est réalisée sur des rats témoins chez lesquels on mesure la libération de XA dans le CPF après stimulation électrique. Les mêmes expériences sont ensuite répétées, mais en plaçant 2.0 de tétródotoxine dans la sonde de dialyse pendant 10 minutes. Dans ces dernières conditions, la libération de XA induite par la stimulation électrique est complètement bloquée (figure 6).

## **2. DISTRIBUTION HETEROGENE DE XA DANS LE CERVEAU DE RAT APRES ADMINISTRATION PERIPHERIQUE.**

**Méthodes:** Les rats sont injectés par voie i.p. avec 50 mg / kg de XA puis sacrifiés 30 minutes après par irradiation aux micro-ondes. Le cerveau est disséqué et le XA est dosé dans 20 régions différentes du cerveau.

**Résultats :** Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (ng / g de cerveau).

5

Structures cérébrales	Concentrations physiologiques	Après injection	Augmentation
Cortex préfrontal	146 ± 90	1297 ± 351	9 fois (**)
Cortex frontal	< 50	1448 ± 165	30 (***)
Cortex pariétal	416 ± 23	2565 ± 692	6 (*)
Cortex temporal	110 ± 60	995 ± 360	9 (*)
Caudé-Putamen	48 ± 4	595 ± 294	12 (*)
Amygdales	297 ± 13	1204 ± 180	4 (*)
Substance noire, VTA	397 ± 73	1307 ± 351	3 (*)

L'accumulation de XA est surtout importante dans le cortex frontal et préfrontal (CPF), dans le cortex temporal et pariétal, dans les amygdales, les noyaux dopaminergiques et dans le striatum.

10

Parmi les structures cérébrales étudiées, les régions ne présentant pas d'accumulation significative d'acide xanthurénique sont les suivantes : Cortex occipital, cortex cingulaire, cortex entorhinal, cortex rétroslénial, bulbes olfactifs, pons, hippocampe, médulla oblongata, cervelet, thalamus, noyau accumbens,

15 septum, globus pallidus et hypothalamus.

### 3. CONCENTRATIONS PHYSIOLOGIQUES DE XA DANS DIVERSES REGIONS DU CERVEAU DE RAT.

20 **Méthodes :** Les animaux sont sacrifiés par irradiation aux micro-ondes, les cerveaux sont rapidement disséqués sur une plaque de verre. De nombreuses structures cérébrales et divers noyaux sont isolés et conservés dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse. Après pesée de chaque structure, les tissus sont homogénéisés dans 10 volumes d'acide perchlorique (w/v) et centrifugés. Les surnageants sont

analysés par HPLC avec détection électrochimique. La limite de détection est de 0.05 nmoles /g de poids frais.

**Résultats :** Les résultats sont présentés sur la Figure 7. Ils montrent une concentration hétérogène, particulièrement élevée dans le cervelet et le bulbe olfactif.

#### 4. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES SITES DE FIXATION POUR L'ACIDE XANTHURENIQUE DANS LE CERVEAU DE RAT.

##### Protocole de préparation des membranes synaptiques :

Les membranes synaptiques ont été préparées selon le protocole décrit ci-après.

15

1°) Prélèvement rapide de deux cerveaux entiers de rats mâles Wistar (décapitation) et pesée des cerveaux.

2°) Homogénéisation des cerveaux dans 10 x le poids en volume de solution S :

S = sucrose 0.32 M

20

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 6.0

EDTA 1 mM

3°) Centrifugation à 915 g à 4°C pendant 10 minutes (Du Pont Instruments, Sorvall RC-5B) et récupération du surnageant.

4°) Centrifugation à 18200 g à 4°C pendant 20 minutes (Du Pont Instruments,

25

Sorvall RC-5B).

5°) Prélèvement du culot et éclatement des synaptosomes dans 70 x le poids en volume d'eau distillée à 0°C. Polytroner 30 secondes à vitesse maximale.

6°) Partage dans des tubes de centrifugation Beckman selon le volume et centrifugation à 51000 g à 4°C (Beckman, ultracentrifugeuse L8-70M) pendant 20 minutes.

30

7°) Lavage des culots dans le tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 6.0 à 0°C

8°) Partage dans des tubes de centrifugation Beckman selon le volume et centrifugation à 51000 g à 4°C (Beckman, ultracentrifugeuse L8-70M) pendant 20 minutes.

9°) Récupération et congélation des culots à -80°C.

5

### Partie 1 : ETUDE DES CARACTERISTIQUES PHARMACOLOGIQUES DU SITE DE LIAISON DE L'ACIDE XANTHURENIQUE SANS IONS

#### **Protocole de liaison**

10

##### Protocole classique :

Le binding est réalisé dans du tampon Pipes 50 mM pH 7,4 à 0°C (sur glace) en présence de membranes synaptiques (quantité protéique variant de 0.1 à 0.3 mg par tube), d'acide xanthurénique tritié ( $[^3\text{H}]\text{-AX}$  en concentration variable selon le type d'expérience) et soit du tampon (pour la détermination de la liaison totale: LT) soit de l'acide xanthurénique "froid" non tritié (Sigma) à 2 mM (pour la détermination de la liaison non spécifique: LNS). La soustraction entre liaison totale et liaison non spécifique donne la liaison spécifique: LS. Le temps d'incubation est de 25 min. La filtration qui permet la séparation du  $[^3\text{H}]\text{-AX}$  libre du  $[^3\text{H}]\text{-AX}$  fixé à son (ses) site (s) de binding s'effectue par aspiration rapide du milieu d'incubation à travers des filtres en fibres de verre (GF/B) whatman qui sont ensuite lavés de façon successive 2 fois par du tampon Pipes 50 mM pH 7,4 froid (en tout 3x3 ml). Les filtres sont placés dans des fioles de comptage et on y ajoute 5 ml de Rotiszint® (Roth). Le comptage s'effectue dans un compteur à scintillation liquide (Beckman LS6000sc).

25

##### Protocole pour la détermination de l'effet pH :

Le binding est réalisé selon le modèle classique: Le milieu d'incubation est préparé à partir de tampon Pipes 50 mM à différents pH (pH étudiés : 5,5 ; 6,0 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5 ; 8,0). La concentration en acide xanthurénique tritié ( $[^3\text{H}]\text{-AX}$ ) est de 200 nM et pour l'étude de la liaison non spécifique on utilise une concentration de 2 mM

30

d'acide xanthurénique non tritié (AX). La soustraction entre liaison totale et liaison non spécifique donne la liaison spécifique qui varie en fonction du pH. Les résultats présentés dans la Figure 8 montrent que le pH optimum de binding de l'acide xanthurénique est de 7,4-7,5.

5

#### Mesure de la zone de proportionnalité en fonction des protéines

Le binding est réalisé selon le modèle classique: Le milieu d'incubation est préparé à partir de tampon Pipes 50 mM pH 7,4 (pH optimum). On fait varier la quantité protéique (0.04 mg à 0.5 mg par tube). La concentration en acide xanthurénique tritié ( $[^3\text{H}]\text{-AX}$ ) est de 200 nM et pour l'étude de la liaison non spécifique on utilise une concentration de 2 mM d'acide xanthurénique non tritié (AX). La soustraction entre liaison totale et liaison non spécifique donne la liaison spécifique qui varie en fonction de la quantité protéique : jusqu'à une quantité protéique de 0.5 mg par tube on reste dans la zone de proportionnalité. Les résultats sont présentés sur la Figure 9. Pour les expériences ultérieures, on travaillera entre 0.15 à 0.3 mg de protéines par tube.

20

#### Mesure des constantes cinétique du binding

##### **\*\* Constante du taux d'association ou ( $k_1$ ou $k_{on}$ ) :**

Le binding est réalisé selon le modèle classique: Le milieu d'incubation est préparé à partir de tampon Pipes 50 mM pH 7,4 (pH optimum). La concentration en acide xanthurénique tritié ( $[^3\text{H}]\text{-AX}$ ) est de 200 nM et pour l'étude de la liaison non spécifique on utilise une concentration de 2 mM d'acide xanthurénique non tritié (AX). La préparation membranaire synaptique est ajoutée dans chaque tube et on procède à la filtration rapide aux différents temps étudiés; les temps d'incubation varient de 1 minute à 40 minutes. La soustraction entre liaison totale et liaison non spécifique donne la liaison spécifique qui augmente en fonction du temps pour atteindre un équilibre : l'équilibre est atteint aux alentours de 10-15 minutes. L'analyse au logiciel Graphpad Prism de l'équation de l'association exponentielle

donne une constante du taux observé  $K_{ob}$  exprimé en  $\text{min}^{-1}$  qui n'est pas le même que le  $k_{on}$ . La valeur du  $k_{ob}$  est de  $0.53 \pm 0.16 \text{ min}^{-1}$  (Figure 10).

Equation utilisée pour le calcul du  $k_{on}$  :

$$5 \quad k_{on} = k_{ob} - k_{off} \quad \text{en } M^{-1} \text{ min}^{-1} \\ \text{[radioligand]}$$

**\*\* Constante du taux de dissociation ou ( $k_{-1}$  ou  $k_{off}$ ) :**

Le binding est réalisé selon le modèle classique: Le milieu d'incubation est préparé à partir de tampon Pipes 50 mM pH 7,4 (pH optimum). On procède à une incubation de la préparation membranaire synaptique avec l'acide xanthurénique tritié (200 nM) pendant 25 minutes (liaison totale) puis on y ajoute l'acide xanthurénique non radiomarké (2 mM) que l'on laisse incubé pendant différents temps pour observer la dissociation et on procède à la filtration rapide; les temps d'incubation varient de 1 minute à 45 minutes. Initialement le  $[^3\text{H}]\text{-AX}$  est lié à son site de binding, l'équilibre est atteint puis plus on incube pendant des temps prolongés avec l'AX non radiomarké plus il y a une diminution du binding qui traduit la dissociation du complexe site de binding- $[^3\text{H}]\text{-AX}$ . La dissociation est rapide et l'analyse au logiciel Graphpad Prism de l'équation de la dissociation exponentielle donne la constante du taux de dissociation  $k_{off}$  exprimé en  $\text{min}^{-1}$ . La valeur du  $k_{off}$  est de  $0.33 \pm 0.07 \text{ min}^{-1}$  (Figure 11).

**\*\*Ces deux constantes permettent d'extrapoler de façon approximative une valeur pour le  $K_d = k_{off}/k_{on} = 330 \text{ nM}$ .**

25

#### Expérience de saturation, mesure réelle du $K_d$ et $B_{max}$

Le binding est réalisé dans du tampon Pipes 50 mM pH 7,4 à  $0^\circ\text{C}$  (sur glace) en présence de membranes synaptiques (quantité protéique variant de 0.1 à 0.3 mg par tube), d'acide xanthurénique tritié et soit du tampon (pour la détermination de la

30

liaison totale) soit de l'acide xanthurénique non radiomarké à 2 mM (pour la détermination de la liaison non spécifique). Le temps d'incubation est de 25 min. puis on procède à la filtration.

- On fait varier la concentration en acide xanthurénique tritié de façon croissante afin
- 5 d'arriver à une occupation des sites de liaison maximale ( plateau de saturation). On réalise la même chose en présence d'un excès d'acide xanthurénique non radiomarké afin de déterminer la liaison non spécifique du [ $^3\text{H}$ ]-AX. Ainsi en soustrayant la liaison totale de la liaison non spécifique on obtient la liaison spécifique de l'acide xanthurénique à son (ou ses) site(s) de binding. L'analyse au
- 10 logiciel Graphpad Prism permet de déterminer l'affinité de l'acide xanthurénique pour son (ou ses) site(s) de liaison : le  $K_d$  est de  $743 \text{ nM} \pm 250 \text{ nM}$ . De même le logiciel Graphpad Prism permet de déterminer le nombre de sites de liaison présents sur une préparation de membranes d'origine synaptique obtenues à partir de cerveaux entiers de rat : le  $B_{\text{max}}$  est de  $6.9 \text{ pmol/mg de protéines} \pm 1.2 \text{ pmol/mg}$
- 15 de protéines (Figure 12).

#### Expérience de compétition, mesure d'une $\text{CI}_{50}$ (concentration inhibitrice 50)

- Le binding est réalisé dans du tampon Pipes 50 mM pH 7,4 à  $0^\circ\text{C}$  (dans la glace) en
- 20 présence de membranes synaptiques (quantité protéique variant de 0.1 à 0.3 mg par tube), d'acide xanthurénique tritié (200 nM) et soit du tampon (pour la détermination de la liaison totale), soit de l'acide xanthurénique non radiomarké à 2 mM (pour la détermination de la liaison non spécifique) et soit des concentrations variables d'une molécule non radiomarkée. Si la molécule reconnaît le site de
- 25 liaison du [ $^3\text{H}$ ]-AX de façon réversible alors les 2 ligands vont entrer en compétition et on obtiendra une courbe de déplacement du [ $^3\text{H}$ ]-AX en fonction de la concentration de la molécule compétitrice. Le temps d'incubation est de 20-25 min. puis on procède à la filtration.

Le radioligand [ $^3\text{H}$ ]-AX a été préparé par hydrogénation catalytique de l'acide 5,7-dichloro-8-hydroxyquinoléine-2-carboxylique en présence de palladium sur charbon (10%) dans le méthanol et en présence de tritium gaz.

Le composé, après purification par HPLC, présente une activité de 10Ci/mmmole.

5

L'analyse au logiciel Graphpad Prism permet de déterminer la CI50 qui représente la concentration de la molécule qui bloque 50 % du binding de l'acide xanthurénique. Lorsque l'on effectue une expérience de compétition entre le [ $^3\text{H}$ ]-AX et l'AX non radiomarké, on obtient une courbe de déplacement dont l'analyse au

10 logiciel Graphpad Prism nous donne un modèle de liaison à deux sites, une CI50 à 300 nM et une CI50 à 57  $\mu\text{M}$ . Selon ce protocole, on peut effectuer des expériences de compétition avec des molécules de synthèse et ainsi identifier ou caractériser des agonistes ou antagonistes, en particulier ayant une meilleure affinité pour le récepteur de l'acide xanthurénique que l'AX lui-même.

15

Pour cela avant de procéder à une expérience de compétition classique pour déterminer une CI50, on effectue d'abord un "screening" c'est à dire que l'on teste à une concentration relativement basse (10  $\mu\text{M}$ ) les molécules sur le déplacement de 200 nM de [ $^3\text{H}$ ]-AX (en gardant comme contrôle l'AX non radiomarké) et l'on

20 regarde si cette concentration déplace de façon identique ou meilleure cette même concentration en AX non radiomarké. Si oui, on détermine la CI 50.

25

L'étude du déplacement du [ $^3\text{H}$ ]-AX par des métabolites du tryptophane (L-kynurénine, 3OH-DL-kynurenine, 5 hydroxy-L- tryptophane, acide picolinique , acide 3 hydroxy anthranilique) dont l'acide xanthurénique fait partie a également été réalisée en screening à 200  $\mu\text{M}$ . Aucun des composés ne déplace de façon significative l'acide xanthurénique. Par contre le screening réalisé sur l'acide kynurénique révèle qu'il n'y a pas de déplacement du [ $^3\text{H}$ ]-AX de son (ses) site(s) de liaison mais une potentialisation de cette liaison. En effet on obtient une liaison de

l'acide xanthurénique tritié supérieure à ce que l'on obtient dans les conditions normales de binding.

#### Effet des ions sur la liaison de l'acide xanthurénique à son (ses) sites de liaison

5

L'étude de l'influence d'ions sur la liaison de l'acide xanthurénique à son (ses) site(s) de liaison est réalisé dans un tampon Tris Maléate 50 mM pH 6.5 à 0°C (dans la glace) en présence de membranes synaptiques (quantité protéique variant de 0.1 à 0.3 mg par tube), d'acide xanthurénique tritié (200 nM) et soit du tampon  
10 (pour la détermination de la liaison totale), soit de l'acide xanthurénique non radiomarké à 2 mM (pour la détermination de la liaison non spécifique) et une concentration de 1 mM en ions. Le temps d'incubation est de 25 minutes. Les ions suivants ont été testés :  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuCl}_2$ );  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnCl}_2$ );  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{MgCl}_2$ );  $\text{Mn}^{2+}$  ( $\text{MnCl}_2$ );  $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{CdCl}_2$ );  $\text{Sn}^{2+}$  ( $\text{SnCl}_2$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{FeCl}_3$ ).

15

Les courbes  $\text{EC}_{50}$  pour les différents ions (Figure 14) donnent la préférence aux ions cuivriques : ceux-ci possèdent un  $\text{EC}_{50}$  d'environ 100  $\mu\text{M}$  alors que les ions zinc possèdent un  $\text{EC}_{50}$  d'environ 500  $\mu\text{M}$ . Une concentration de 100-200  $\mu\text{M}$  en ions cuivriques représente approximativement les concentrations endogènes  
20 cérébrales.

20

D'autre part, au cours de nos recherches sur l'existence de ligands endogènes cérébraux pouvant jouer un rôle au niveau du site de binding XA ou au niveau d'un site modulateur de ce récepteur, nous avons constaté que l'adénine et ses dérivés  
25 [adénosine, adénosine diphosphate (ADP) ou adénosine triphosphate (ATP)] présentaient une affinité significative pour le site xanthurénique et inhibaient la fixation de XA tritié. Il est très probable que ces dérivés jouent un rôle important dans la modulation de l'activité du site XA au niveau cérébral. Ces molécules peuvent représenter des modèles pour la réalisation de ligands analogues

structuraux pouvant interférer avec les sites XA pour la confection d'outils thérapeutiques ou pharmacologiques.

## **Partie 2 : ETUDE DES CARACTERISTIQUES PHARMACOLOGIQUE S DU SITE**

### **5 DE LIAISON DE L'ACIDE XANTHURENIQUE EN PRESENCE D'IONS CUIVRE (Cu<sup>2+</sup>)**

#### **10 Protocole de Binding classique (protocole établi à partir des études du pH, de la proportionnalité, des constantes cinétique et de la saturation)**

Le binding est réalisé dans du tampon Tris Maléate 50 mM pH 6.5 à température ambiante en présence de membranes synaptiques (quantité protéique variant de 0.1 à 0.25 mg par tube), d'acide xanthurénique tritié ([<sup>3</sup>H]-AX en concentration variable selon le type d'expérience), 200 µM de CuCl<sub>2</sub> et soit du tampon (pour la détermination de la liaison totale: LT) soit de l'acide xanthurénique "froid" non tritié (Sigma) à 2 mM (pour la détermination de la liaison non spécifique: LNS). La soustraction entre liaison totale et liaison non spécifique donne la liaison spécifique: LS. Le temps d'incubation est de 25 min. La filtration qui permet la séparation du [<sup>3</sup>H]-AX libre du [<sup>3</sup>H]-AX fixé à son (ses) site (s) de binding s'effectue par aspiration rapide du milieu d'incubation à travers des filtres en fibres de verre (GF/B) Whatman qui sont ensuite lavés de façon successive 2 fois par du tampon Tris Maléate 50 mM pH 6.5 à température ambiante (en tout 3x3 ml). Les filtres sont placés dans des fioles de comptage et on y ajoute 5 ml de Rotiszint® (Roth). Le comptage s'effectue dans un compteur à scintillation liquide (Beckman LS6000sc).

#### **Effet pH :**

Le binding est réalisé selon le modèle classique: Le milieu d'incubation est préparé à partir de tampon Tris Maléate 50 mM à température ambiante à différents pH (pH

étudiés : 5,5 ; 6,0 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5 ; 8,0). La concentration en acide xanthurénique tritié ( $[^3\text{H}]\text{-AX}$ ) est de 200 nM (+ 20  $\mu\text{M}$  d'acide xanthurénique) et pour l'étude de la liaison non spécifique on utilise une concentration de 2 mM d'acide xanthurénique non tritié (AX). Le milieu d'incubation contient 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuCl}_2$ . La soustraction

5 entre liaison totale et liaison non spécifique donne la liaison spécifique qui varie en fonction du pH (Figure 15) : le pH optimum de binding de l'acide xanthurénique est de 6,4-6,5.

Mesure de la zone de proportionnalité en fonction des protéines :

10

Le binding est réalisé selon le modèle classique: Le milieu d'incubation est préparé à partir de tampon Tris Maléate 50 mM pH 6.5 à température ambiante (pH optimum). On fait varier la quantité protéique (0.07 mg à 0.4 mg par tube). La concentration en acide xanthurénique tritié ( $[^3\text{H}]\text{-AX}$ ) est de 200 nM et pour l'étude

15 de la liaison non spécifique on utilise une concentration de 2 mM d'acide xanthurénique non tritié (AX). Le milieu d'incubation contient 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuCl}_2$ . La soustraction entre liaison totale et liaison non spécifique donne la liaison spécifique qui varie en fonction de la quantité protéique : Jusqu'à une quantité protéique de 0.25 mg par tube on reste dans la zone de proportionnalité (Figure 16). Pour les

20 expériences ultérieures, on travaillera entre 0.10 à 0.25 mg de protéines par tube.

Mesure de l'effet dose du cuivre sur le binding de l'acide xanthurénique

Le binding est réalisé selon le modèle classique: Le milieu d'incubation est préparé à partir de tampon Tris Maléate 50 mM pH 6.5 à température ambiante (pH optimum). On fait varier la concentration en cuivre ( $\text{CuCl}_2$ ) de  $3 \cdot 10^{-7}$  M à  $3 \cdot 10^{-4}$  M. La concentration en acide xanthurénique tritié ( $[^3\text{H}]\text{-AX}$ ) est de 400 nM (et 20  $\mu\text{M}$  d'acide xanthurénique) et pour l'étude de la liaison non spécifique on utilise une

25 concentration de 2 mM d'acide xanthurénique non tritié (AX). On obtient une courbe

effet dose dont l'analyse au logiciel Graphpad Prism nous donne une EC50 (concentration efficace 50) à 33.4  $\mu$ M avec un coefficient de Hill de 1.8 (Figure 17).

#### Expérience de saturation, mesure réelle du $K_d$ et $B_{max}$

5

Le binding est réalisé dans du tampon Tris Maléate 50 mM pH 6.5 à température ambiante en présence de membranes synaptiques (quantité protéique variant de 0.10 à 0.25 mg par tube), d'acide xanthurénique tritié et soit du tampon (pour la détermination de la liaison totale) soit de l'acide xanthurénique non radiomarké à 2

10 mM (pour la détermination de la liaison non spécifique). Le temps d'incubation est de 25 min. puis on procède à la filtration.

On fait varier la concentration en acide xanthurénique tritié de façon croissante afin d'arriver à une occupation des sites de liaison maximale ( plateau de saturation). On

réalise la même chose en présence d'un excès d'acide xanthurénique non

15 radiomarké afin de déterminer la liaison non spécifique du [ $^3$ H]-AX. Ainsi en soustrayant la liaison totale de la liaison non spécifique on obtient la liaison

spécifique de l'acide xanthurénique à son (ou ses) site(s) de binding. L'analyse au

logiciel Graphpad Prism permet de déterminer l'affinité de l'acide xanthurénique

20 pour son (ou ses) site(s) de liaison : le  $K_d$  est de 7.56  $\mu$ M  $\pm$  0.8  $\mu$ M. De même le

logiciel Graphpad Prism permet de déterminer le nombre de sites de liaison présents sur une préparation de membranes d'origine synaptique obtenues à partir de cerveaux entiers de rat : le  $B_{max}$  est de 581.8 pmol/mg de protéines  $\pm$  33 pmol/mg de protéines (Figure 18).

#### 25 Expérience de compétition, mesure d'une CI50 (concentration inhibitrice 50)

Le binding est réalisé dans du tampon Tris Maléate 50 mM pH 6.5 à température ambiante en présence de membranes synaptiques (quantité protéique variant de 0.1 à 0.3 mg par tube), d'acide xanthurénique tritié (200 nM) et soit du tampon

(pour la détermination de la liaison totale), soit des concentrations variables d'AX non radiomarké ( $10^{-3}$  M à  $10^{-10}$  M).

L'analyse au logiciel Graphpad Prism permet de déterminer la CI50 qui représente la concentration de la molécule qui bloque 50 % du binding de l'acide xanthurénique. L'expérience de compétition entre le [ $^3$ H]-AX et l'AX non radiomarké, permet d'obtenir une courbe de déplacement dont l'analyse au logiciel Graphpad Prism nous donne un modèle de liaison à deux sites, une CI50 à 1  $\mu$ M et une CI50 à 114  $\mu$ M (Figure 19).

10

- Etude de la distribution régionale des sites de liaison de XA dans le cerveau de rat par autoradiographie quantitative suivie d'analyse d'images.

- 15 **Méthode :** trois cerveaux de rat males Wistar adultes sont rapidement extraits après décapitation de l'animal et congelés dans de l'isopentane maintenu à  $-40^{\circ}\text{C}$  par de la carboglace. Les divers cerveaux sont ensuite sectionnés à l'aide d'un cryostat en coupes de 20  $\mu$ m d'épaisseur. Ces coupes sont étalées sur des lamelles de verre qui sont ensuite rapidement séchées à l'air froid. Les lamelles, assemblées
- 20 sur un cadre, sont ensuite incubées pendant 10 minutes dans un tampon PIPES 50 mM, pH 7.4, maintenu à  $0^{\circ}\text{C}$  par de la glace. Les lamelles sont ensuite trempées pendant 20 minutes dans le même tampon, contenant en plus 200 nM de XA radioactif. Après trois bref lavages de chacun 10 secondes dans le tampon PIPES dépourvu de ligand radioactif, les coupes sont séchées par un courant d'air froid.
- 25 Elles sont ensuite exposées à l'obscurité contre un film sensible au tritium. Après 2 mois d'exposition dans des cassettes hermétiques, les films sont développés et les niveaux de gris sont numérisés et comparés à une échelle de radioactivité tritium arbitraire, calibrée en Curie par gramme d'équivalent tissu (Amersham). Les résultats, qui représentent à un facteur près, la répartition des densités des
- 30 récepteurs XA dans les diverses régions du cerveau de rat, sont données dans le tableau ci-joint.

Distribution régionale des sites de liaison du [ $^3\text{H}$ ] Xanthurénate.  
(Coupes sériées de 20  $\mu\text{m}$  de cerveau de Rat Wistar).

5

Structure cérébrale	Valeur densitométrique intégrée nCi / g t SD (n=3)		
Noyau caudé partie latérale	195 t 3.1	1942.6 t 30.3	252.0 t 4.0 fmol /mg
Substance noire compacte (A <sub>9</sub> )	126 t 2.0	806.5 t 13.8	104.6 t 1.8
Noyau interpédonculaire	127 t 4.3	822.9 t 17.3	106.8 t 2.2
Noyau amygdale centrale	194 t 4.3	1921.3 t 42.9	249.4 t 5.6
Hippocampe dorsal	203 t 9.8	2068 t 41.1	268.5 t 5.3
Hippocampe ventral	128 t 2.1	847.5 t 16.9	110.0 t 2.2
Noyau thalamus médiodorsal	172 t 3.5	1568.8 t 39.3	203.7 t 5.1
Noyau thalamus median post.	180 t 7.5	1701 t 69.9	220.9 t 9.0
Hypothalamus dorsomédian	180 t 6.3	1700 t 73.2	220.7 t 9.5
Aire tegmentale ventrale (A <sub>10</sub> )	119 t 7.5	691.8 t 43.6	89.8 t 5.6
Noyau accumbens latéral	193 t 10	1904.9 t 99.0	247.3 t 12.8
Noyau raphé dorsal (B <sub>7</sub> )	121 t 10	724.5 t 59.8	94.1 t 7.7
Noyau raphé médian (B <sub>8</sub> )	110 t 2.0	544.2 t 16.9	70.6 t 2.2
Lobules cérébelleux	180 t 3.5	1740.9 t 58.5	226.0 t 7.6
Cortex pariétal	184 t 1.4	1757.3 t 23.3	228.2 t 3.0
Cortex temporal	115 t 7.7	634.4 t 52.3	82.4 t 6.8
Cortex cingulaire partie ant.	180 t 5.2	1691.8 t 49.5	219.7 t 6.4
Cortex préfrontal	180 t 11.5	1691.8 t 108.2	219.7 t 14.0
Gris périaqueducal	125 t 5.65	724.5 t 40.0	94.1 t 5.2
Cortex pyriforme	186 t 7.7	1798.3 t 91.7	233.5 t 11.9
Bulbes olfactifs	181 t 7.0	1703 t 81.5	221.2 t 10.6
Medulla oblongata	149 t 4.9	1249.1 t 50.7	162.2 t 6.6

Globus pallidus	163 t 7.7	1413.2 t 67.2	183.5 t 8.7
Noyau septum latéral	175 t 6.1	1609 t 55.7	208.9 t 7.2
Noyau septum médian	147 14.9	1150 t 116.3	149.4 t 15.1
Cortex occipital	152 t 51	1232 t 291.7	160.0 t 37.8

## 5. ETUDE DE LA MODULATION PAR LE XA DE L'ACTIVITE DOPAMINERGIQUE NIGRO-STRIEE ET MESO-CORTICO-LIMBIQUE.

5

### Matériels et Méthodes

- **Animaux** : Rats males adultes Wistar pesant 250 à 275 g, hébergés par deux dans des cages plastiques avec une illumination standard de 7h à 19 heures et ayant un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les études sur ces animaux ont été menées en accord avec les règlements du Conseil des Communautés Européennes du 24 novembre 1986 ( 86/609/EEC).

10

- **Produits chimiques**: XA; 6-OHDA hydrobromide; 2,4,5-trihydroxyphenylethylamine et desipramine ont été obtenus chez Sigma). Le NCS-486 a été fabriqué par le Laboratoire de Pharmacochimie du CNRS, Strasbourg.

15

- **Protocole chirurgical**: Une canule en I, avec une extrémité de 4 mm, (CMA 12, Carnegie, Suède) a été utilisée pour les expériences, . La membrane de dialyse, de diamètre 500 µm, est constituée de polycarbonate-polyether avec un seuil d'arrêt à 20 Kda. Le guide de sonde est implanté dans le CPF sous repaire stéréotaxique, les animaux étant anesthésiés par du chlorhydrate de kétamine (150 mg / kg / i.p.)

20

25

- **Lésions à la 6-hydroxydopamine des noyaux dopaminergiques A9 et A10**

Les animaux sont anesthésiés à la Kétamine (100 mg /kg i.p.). La 6-OHDA est dissoute dans du sérum physiologique contenant 0.01% d'acide ascorbique à la concentration de 4 µg / µl. Un µl sont injectés en deux minutes, sous repaires stéréotaxiques, à l'aide d'une seringue de Hamilton dans A9/A10. Après injections, on attend la diffusion de la toxine pendant une minute. Les neurones noradrénergiques sont protégés par l'injection préalable à l'animal de desipramine 25 mg/ kg i.p. , 45 minutes avant la 6-OHDA.

4 semaines après, les rats sont administrés par 1 mg/kg d'apomorphine en injection sous-cutanée et le nombre de tours contralatéraux effectués 15 minutes après l'injection, sont enregistrés.

Les rats lésés ont effectué  $130 \pm 45$  tours / 15 minutes. Six semaines après l'injection locale de 6-OHDA dans les nayaux dopaminergiques A9/A10 droits, les rats présentant une bonne altération fonctionnelle ont été sélectionnés et implantés pour des études en microdialyse.

#### • Protocole de microdialyse

Les expériences ont été réalisées sur des rats conscients lésés et non lésés, 24 à 48 heures après l'intervention chirurgicale (mise en place du guide de microdialyse). La composition du milieu de microdialyse est : NaCl 147 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM; KCl 4,0 mM, pH 6,5. La vitesse de dialyse est de 1 µl / min (pompe CMA 100, Carnegie). Les dialysats sont collectés toutes les 20 minutes et immédiatement stockés dans l'azote liquide jusqu'à l'analyse.

#### • Analyse de la dopamine, DOPAC et HVA dans les liquides de microdialyse

Ces composés sont analysés par HPLC avec détection électrochimique. Le système chromatographique consiste en une colonne 25 cm X 4.6 mm C18 maintenu à une température constante de 30°C. La phase mobile est constituée de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM contenant 0.1 mM EDTA et du méthanol 6%, le pH de la solution étant réglé à 4.85.

- **Rendements in vitro**

Le rendement in vitro pour le dialyse de la dopamine a été préalablement mesuré à 16% à la température du laboratoire et pour une vitesse de dialyse de 1  $\mu$ l / min.

- **Histologie**

- 5 Après les expériences, le placement correct de la sonde est toujours vérifié par examen histologique post-mortem du cerveau de l'animal, après fixation dans du paraformaldéhyde.

- **Analyses statistiques**

- 10 Les analyses de microdialyse ont été évaluées statistiquement par un ANOVA suivi d'un test de comparaison multiples de Newman-Keuls.

## RESULTATS

15

- **Effet / dose du XA infusé localement dans le CPF sur la modification des concentrations extracellulaires de dopamine.**

- 20 Les concentrations de XA retrodialysées ont été respectivement de 1  $\mu$ M (cercles noirs), de 5  $\mu$ M (carrés noirs) et de 20  $\mu$ M (triangles noirs). L'application de XA se fait pendant une dialyse de 20 minutes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la libération moyenne de base pour la dopamine (8 fractions de 20 min avant la stimulation par le XA), Figure 20.

La plus faible concentration en XA (1  $\mu$ M) ne modifie pas la libération de dopamine.

- 25 Par contre, la concentration de 5  $\mu$ M (environ 1.5  $\mu$ M de XA dans le tissu cérébral selon les données du rendement in vitro) fait augmenter la libération extracellulaire de dopamine d'environ 250%. La dose de 20  $\mu$ M (environ 6  $\mu$ M dans le tissu) fait augmenter la dopamine à 400-450%.

30

- **Effets de l'application locale de 20  $\mu$ M de XA dans le CPF sur les taux de dopamine, DOPAC et HVA.**

Les résultats sont exprimés en pourcentage de dopamine libéré par rapport à la ligne de base (8 x 20 min de dialyse avant l'injection du XA), Figure 21. Les carrés noirs représentent la dopamine, les cercles noirs représentent le DOPAC et les carrés blancs représentent l'HVA. Dans ce cas, l'augmentation de dopamine est, comme précédemment, de 400-450% du niveau basal après 20 minutes, mais les taux de DOPAC et d'HVA baissent légèrement au bout de 100 à 120 minutes.

- 10      • Effets de l'application locale de 20  $\mu$ M de XA dans le CPF sur la libération extracellulaire de dopamine, en présence ou en absence de 20  $\mu$ M de NCS-486.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la libération basale de dopamine (moyenne de 8 x 20 minutes fractions de dialysats avant le traitement avec XA (Figure 22). Application de 20  $\mu$ M de XA pendant 20 minutes (cercles noirs), ou co-infusion de XA 20  $\mu$ M + NCS 486 20  $\mu$ M (carrés blancs) ou application de 20  $\mu$ M de NCS-486 seul (triangles blancs). On peut observer que le traitement avec NCS-486 seul ou NCS-486 + XA ne modifient pas la libération de dopamine, par contre XA seul augmente cette libération de 300% environ, 40 minutes environ après la stimulation.

## 6. ETUDES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

### 25      Enregistrements électrophysiologiques

Les cellules de la lignée neuronale NCB-20 étaient enregistrées grâce à la technique du patch-clamp (Hamill et al., 1981) dans sa configuration dite cellule attachée. Les milieux d'enregistrements étaient conçus tel que seule l'activité des canaux cationiques aspécifiques et des canaux à chlorure se trouvant dans le

- fragment de membrane sous la pipette, pouvait être enregistrée de manière isolée. Les courants spécifiques calciques, sodiques et potassiques étaient minimisés par substitution de la majorité des cations du milieu pipette, par un cation imperméant la N-méthyl-D- glucamine (NMDG) ou blocage par du TEA (Tétra-Ethyl-Ammonium).
- 5 La substitution des cations perméants dans la pipette par la NMDG permettait aussi d'avoir les courants cationiques aspécifiques essentiellement dans le sens sortant la composante entrante étant minimisée. En outre, dans certaines expériences l'activité des canaux à chlorure était enregistrée uniquement dans le sens entrant grâce au remplacement des ions chlorure du milieu pipette par du TCA (acide
- 10 trichloracétique). Le contrôle du potentiel de membrane cellulaire à une valeur proche de zéro mV se faisait en utilisant un milieu extracellulaire KCl. Ainsi le potentiel du fragment de membrane enregistré correspond à l'opposé du potentiel imposé dans la pipette d'enregistrement. Dans ces conditions les solutions d'enregistrement avaient la composition suivante : (en mM) : NMDG/Cl(ou TCA)
- 15 140, KCl 2,  $MgCl_2$  1, HEPES 10, TEA/Cl 15, pour le milieu pipette et NaCl , KCl 141,  $CaCl_2$  0.5, HEPES 10, EGTA 5, pour le bain, le pH était ajusté dans les deux cas à 7.4 avec respectivement du TRIS base et KOH.

Les produits chimiques provenaient de chez Sigma (Saint Quentin Fallavier,

20 France).

Après réalisation d'un 'gigaseal' avec des pipettes d'une résistance comprise entre 4 et 7 M $\Omega$ , les courants ioniques étaient mesurés grâce à un amplificateur de patch-clamp (EPC-7 amplifier, List-Medical, Darmstadt, RFA ou Axopatch B200, Axon Instruments, CA). L'acquisition du signal se faisait ensuite (Fréquence

25 d'acquisition de 1 à 5 kHz) à l'aide d'une carte interface (Scientific Instruments, OH) et du logiciel pClamp 6 (Axons Instruments, CA). Les produits étaient dilués à la concentration voulue dans le milieu extracellulaire. L'application se faisait par gravité à travers un système de perfusion multivoies chacune d'elles ayant un diamètre interne de 300  $\mu m$ .. Le changement de solution s'opérait en plaçant après

30 ouverture du robinet la voie correspondante en face de la cellule enregistrée.

## Résultats

- Les cellules NCB-20 expriment un site de liaison qui reconnaît spécifiquement l'acide xanthurénique. Le but de ces expériences fonctionnelles était de détecter tout phénomène membranaire électrogénique pouvant être activé par le(s) récepteur(s) de l'acide xanthurénique. Certains arguments laissaient à penser que ce récepteur est couplé aux protéines G et donc qu'un effet membranaire passerait par un relais intracellulaire. Nous avons en conséquence prospecté une éventuelle action sur les perméabilités cationiques et chlorures dont l'activation dépend à la fois du potentiel de membrane et de facteurs cytosoliques (essentiellement l'ion calcium et les protéines kinases; Evans and Marty, 1987; Taleb et al., 1988; Leech et al., 1996). Ces deux types de canaux ioniques ont donc été enregistrés de manière isolée (voir méthodes) et selon la mise en jeu de l'une ou l'autre des deux perméabilités. Le potentiel d'inversion de la réponse serait compris entre  $-49.5$  ou  $-11.8$  mV respectivement pour une réponse cationique (cations monovalents) ou chlorure. Dans ces conditions tout changement au niveau des facteurs cytoplasmiques sera révélé par les paramètres de la relation courant potentiel (Figure 23).
- Les cellules étaient enregistrées en cellule-attachée. Le courant traversant les canaux insérés dans la membrane sous la pipette était enregistré de manière isolée. Le potentiel de la membrane cellulaire était imposé à  $0$  mV par une concentration de KCl dans le bain équivalente à celle du milieu cytoplasmique. Dans ces conditions le potentiel du fragment de membrane sous la pipette est opposé à celui de la pipette.

### Effet de l'acide xanthurénique sur l'activation du courant cationique

- Le fragment de membrane enregistré était périodiquement stimulé (fréquence  $0.2$  Hz) par une rampe de potentiel de  $-70$  à  $100$  mV (voir protocole dans la Fig.24 A,

trace du bas). Dans les conditions contrôles utilisant un milieu pipette pauvre en ion chlorure (substitués par du TCA), le courant enregistré était stable et avait une amplitude de  $-0.4 \pm 0.1$  et  $8.6 \pm 0.2$  pA ( $n = 30$ ) aux potentiels respectifs de  $-70$  et  $100$  mV. Ce courant s'inversait à un potentiel de  $-48.3 \pm 3.5$  mV ( $n = 3$ ). Cette valeur  
5 proche du potentiel d'inversion des cations monovalents ( $-49.5$  mV, si on estime que la concentration intracellulaire des ions  $K^+$  et  $Na^+$  est respectivement de  $140$  et  $2$  mM ) montre dans ces conditions d'enregistrement, qu'il y a une perméabilité basale sélective aux cations. La relation courant potentiel présentait une forte rectification sortante (Fig.24A et C), en accord avec la distribution asymétrique des  
10 cations de part et d'autre du fragment de membrane enregistré. En présence de l'acide xanthurénique à une concentration de  $1$  à  $20$   $\mu$ M après un délai (de  $1$  à  $4$  min) dépendant de la concentration de l'agoniste, l'amplitude du courant cationique est augmentée (de  $10$  à  $40$  %) avec une cinétique lente sur lequel peut se greffer des courants transitoires de grande amplitude. Dans le cas de la fig.24,  
15 l'augmentation de l'amplitude du courant au pique du transitoire et au potentiel de  $100$  mV était d'un facteur 5.

En moyenne, pour une concentration de  $20$   $\mu$ M de l'agoniste, l'amplitude du courant est augmentée d'un facteur  $5.0 \pm 1.7$  ( $n=3$ ). La relation I-V du courant  
20 spécifiquement activé en présence de l'acide xanthurénique (après soustraction du courant obtenu en conditions contrôle) a des caractéristiques similaires à celle du courant contrôle (Fig.24C). En particulier, le potentiel d'inversion était quasiment identique à celui du contrôle et avait d'une valeur moyenne de  $-51.6 \pm 2.1$  ( $n=3$ ). Ceci est vrai à la fois pour le courant lent et pour le courant transitoire. Cette valeur  
25 du potentiel d'inversion est voisine du potentiel d'équilibre des cations monovalents ce qui suggère que l'acide xanthurénique peut induire dans ces conditions, l'activation d'un courant de nature cationique. Le fait que ce courant soit enregistré au niveau d'un fragment de membrane physiquement isolé du reste de la cellule où l'agoniste est appliqué, montre que l'activation de ces canaux cationiques passe par  
30 un relais intracellulaire intermédiaire entre le récepteur et le canal.

Pour répondre à la question si ces canaux cationiques laissent passer aussi les cations divalents, en particulier le calcium, nous avons réalisé le même type d'expérience que précédemment mais avec un milieu pipette contenant essentiellement des ion  $Ba^{2+}$  (l'ensemble des cations monovalent est remplacé par du  $Ba^{2+}$  à l'exception de 2 mM d'ions  $K^+$  et 15 mM d'ions  $TEA^+$ ). Dans ces conditions aussi on observe en présence de l'acide xanthurénique, l'activation d'un courant dont le potentiel d'inversion avait cette fois ci une valeur moyenne de  $2.6 \pm 2.5$  mV ( $n=7$ ). La substitution des cations monovalents par le  $Ba^{2+}$  a déplacé le potentiel d'inversion de la réponse d'environ 54 mV. Dans le cas où les ions  $Ba^{2+}$  ne participeraient pas au courant activé par l'agoniste, le potentiel d'inversion attendu aurait une valeur de -53.5 mV. La différence observée témoigne du passage des ions  $Ba^{2+}$  à travers les canaux cationiques.

#### 15 Effet de l'acide xanthurénique sur l'activation d'un courant chlorure

Sur un certain nombre de réponses en particulier celles qui ne présentent pas de courant transitoire, on a observé cependant une évolution du potentiel d'inversion du courant induit par l'agoniste. Ainsi dans le cas illustré dans la Fig.25, le début de la réponse avait un potentiel d'inversion de -16.5 mV qui témoigne de la contamination du courant cationique par un autre courant dont le potentiel d'équilibre a une valeur plus dépolarisée. Dans une deuxième phase de la réponse le potentiel a évolué vers une valeur encore plus dépolarisée -4.2 mV. le courant qui s'est rajouté a un potentiel d'inversion compatible avec un mouvement d'ions chlorure dans nos conditions expérimentales.

#### Pharmacologie de la réponse à l'acide xanthurénique

Le NCS-482 appliqué à une concentration de 10 à 20  $\mu M$  à la cellule NCB-20, induit une réponse quasi-identique à celle de l'acide xanthurénique (Fig.25 et 26). Ce résultat, montre que le NCS-482, une molécule dérivé de l'acide xanthurénique capable de déplacer la liaison de l'acide xanthurénique, a des propriétés d'agoniste

sur le récepteur du Xanthurénate. Le NCS-486 qui est un autre dérivé de l'acide xanthurénique et qui déplace également la liaison de l'acide xanthurénique, n'a aucune action quand il est appliqué seul (20 $\mu$ M) par contre sa présence réduit l'amplitude de la réponse induite par l'agoniste (Fig.26). Ce qui lui confère des propriétés antagonistes sur le récepteur du xanthurénate.

## **7. NEUROPHARMACOLOGIE DE L'ACIDE XANTHURENIQUE (XA) EVALUATION COMPORTEMENTALE CHEZ LE RAT.**

10

### **1) Mesure de l'activité locomotrice par cellules infra-rouges :**

Les doses étudiées ont été les suivantes : 12.5, 25, 37.5, 50, 100 et 200 mg/kg (i.p.) (Figure 27). Ce test a mis en évidence une diminution de l'activité motrice, et ceci à des doses de XA supérieures ou égales à 50 mg/kg.

15

L'intensité de la sédation observée a été proportionnelle à la quantité de produit injectée.

### **2) Mesure de la réactivité globale de l'animal par le test « open field ».**

20

Ce test a confirmé l'absence de sédation à la dose de 37.5 mg/kg, dose à laquelle l'exploration du centre de la cage était significativement augmentée, ceci pouvant être interprété comme un effet anxiolytique potentiel (Figure 28). Cette tendance a été confirmée par un test évaluant les interactions sociales entre deux congénères (Ramos et al. *Behav Brain Res* 85 1997 57 – 69). La dose de 50 mg/kg a montré un effet significatif de l'augmentation de la durée des interactions sociales de l'animal traité par rapport à son congénère témoin non traité. A la dose de 100 mg/kg, la sédation significative induite par le produit a perturbé cette évaluation.

25

30

### **3) Mise en evidence d'un effet de type antidépresseur par le test de Porsolt.**

Les doses utilisées ont été les suivantes : 50, 100, 150 et 200 mg/kg i.p.

Ce test a été validé par l'Imipramine 30 mg/kg. Le test utilisé est le test de Porsolt et al. Eur. J Pharmacol 47 (1978) 379 – 391.

5

Les doses de 100, 150, 200 mg/kg ont montré une diminution statistiquement significative des durées cumulées d'immobilité indiquant un effet similaire à celui obtenu par l'Imipramine (Figures 29 et 30).

**10      4) Mise en évidence d'un effet de l'ac xanthurénique sur les processus de mémorisation par le test de reconnaissance d'objets.**

Ennaceur et Delacour ; Behav Brain Res 31 (1988) 47 – 59.

Les doses utilisées ont été les suivantes : 37.5 et 75 mg/kg i.p.

15

Les résultats obtenus (Figure 31) ont montré une augmentation significative de l'indice de reconnaissance des objets par les animaux traités par rapport aux contrôles. L'augmentation de cet indice peut être interprétée comme un apport bénéfique du produit favorisant la mémoire à court terme.

20

**5) Effets de l'ac. xanthurénique après injections intracérébrales.**

Le produit a été injecté par voie intra-cérébroventriculaire (i.c.v) d'une part, et dans des structures cérébrales définies d'autre part : aire tegmentale ventrale (A10), substance noire (A9) ou noyau accumbens. Pour les doses de 2, 4, 10, 50 µg/rat de XA, des stéréotypies proportionnelles à la dose injectée ont été observées. Après disparition des stéréotypies (30 minutes  $\pm$  15), la ré-injection du XA a conduit aux mêmes observations.

25

**30      6) Etude des potentialités antagonistes du NCS-486 sur des animaux dont les voies nigrostriatale et mésocorticolimbique ont été lésées de**

manière unilatérale par des injections intracérébrales (VTA ; SNc) d'un neurotoxique (6-OHDA) après protection des neurones noradrénergiques par prétraitement à la désipramine.

- 5 L'injection d'une dose non sédatrice de XA (25 mg / kg i.p.) n'antagonise pas les rotations contralatérales induites par l'injection d'apomorphine (0.05, 0.1 mg /kg s.c.)
- La recherche d'une potentialisation des rotations ipsilatérales induites par l'amphétamine et l'antagonisme éventuel du NCS-486 sur les rotations ipsilatérales
- 10 induites par 25 mg / kg i.p. de xanthurénate est en cours.

**7) Analyse électroencéphalographique (EEG) de la sédation induite par l'injection (i.p.) d'ac. xanthurénique.**

- 15 Les doses étudiées se sont réparties entre 50 et 500 mg/kg (i.p.). L'analyse E.E.G détaillée n'avait pas mis en évidence de tracé de type « épileptique » ou de type « sommeil lent profond ». Seule une réduction de l'amplitude des ondes EEG a été observée. Cette sédation était accompagnée d'une baisse significative de la température corporelle proportionnelle à la dose de produit injectée (- 0.5° à -2°C).

20

**EN CONCLUSION,** les tests neuropharmacologiques que nous avons menés chez le rat après traitement à l'acide xanthurénique soit par voie périphérique, soit par voie locale, ont montré :

25

Le XA possède un effet sédatif chez l'animal, avec un effet / dose très démonstratif. Cet effet sédatif est corroboré par plusieurs tests. Dans l'open field où on observe le comportement spontané de l'animal, nous avons pu remarquer que le XA possédait un effet anxiolytique à des doses non sédatives et qu'il favorisait les interactions

30 sociales. Certains tests visant à explorer un effet antidépresseur du XA ont montré

que celui-ci potentialisait l'humeur de l'animal, suivant un effet / dose. Des tests mnésiques démontrent que le XA favorise la mémoire à court terme. Enfin, cette substance possède un fort pouvoir dopaminergique objectivé par l'induction de stéréotypies. Ces stéréotypies sont bloquées par l'antagoniste NCS-486 à fortes doses. L'examen EEG ne montre pas d'effets épileptiques du XA ou d'effet inducteur sur le sommeil lent profond, par contre on observe une diminution de l'amplitude du tracé et une hypothermie, ces deux phénomènes pouvant être corrélés à la sédation.

10

## **8. Mise en évidence et caractérisation d'un système de transport pour le XA en culture de neurones.**

### **1) Matériel et Méthodes**

15

#### ***MISE EN CULTURE DES CELLULES NCB-20.***

##### **Entretien de la souche cellulaire.**

20

Les cellules NCB-20 sont conservées congelées dans l'azote liquide sous forme d'aliquotes provenant de la souche mère. Dans le cadre d'une étude, un aliquote est décongelé et mis dans les conditions de culture adéquate à l'étude. Pour entretenir la lignée, dès que la boîte de culture cellulaire arrive à confluence, la boîte initiale sert à ensemençer une autre boîte en ne prélevant qu'une partie aliquote des cellules mis en suspension cellulaire dans la boîte d'origine. Ainsi, les repiquages sont réalisés dans du milieu de DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF) et la dilution est généralement une dilution au dixième.

30 **Culture des cellules NCB-20 différenciées.**

La culture des cellules est préparée grâce à une boîte de culture de cellules NCB-20 confluente à 80%. Le milieu de culture est éliminé puis remplacé par 10 ml de DMEM contenant 10% de SVF. Les cellules sont alors décollées et mises en suspension par passages répétés du milieu à travers une aiguille de 2 mm de diamètre. Les cellules sont ensuite comptées dans un hémocytomètre. La suspension finale est ajustée à une densité cellulaire de  $3.10^4$  cellules/ml de milieu DMEM contenant 10% de SVF et 1 mM d'AMPc. Les boîtes de pétri sont ensemencées avec 2 ml de cette suspension puis incubées à 37°C en atmosphère saturée d'humidité et en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont utilisées 4 jours après leur mise en culture.

#### *MESURE DU TRANSPORT DE XA DANS LES CELLULES NCB-20*

A partir de cellules NCB-20 de 4 jours différenciées à l'AMPc, le milieu de culture est remplacé par une des solutions tampon décrites précédemment (Krebs avec ou sans Na<sup>+</sup>, permettant d'appréhender respectivement le transport actif Na<sup>+</sup>-dépendant et le transport passif qui relève principalement de la diffusion) selon l'expérience envisagée. Les boîtes de culture sont placées dans un bain-marie à 37°C pendant 10 minutes. Le tampon est ensuite remplacé par la même solution tampon contenant du [<sup>3</sup>H]XA et du XA à des concentrations variants de 1 à 500 µM. Le [<sup>3</sup>H]XA est présent à très faible concentration et ne joue qu'un rôle de traceur du XA froid (non radioactif). Après une minute d'incubation, les solutions sont aspirées et les cellules sont lavées 3 fois 10 secondes avec 1 ml du même tampon (Krebs avec ou sans Na<sup>+</sup>), maintenu dans la glace. Le transport actif nécessite de l'énergie (ATP) et est fortement ralenti à des températures inférieures à 37°C. Le tapis cellulaire lavé est congelé dans les boîtes puis, le lendemain, de l'eau distillée est ajoutée pour obtenir une solution de débris cellulaire contenant le radioactif intracellulaire ([<sup>3</sup>H]XA). La congélation permet de faciliter l'homogénéisation par des passages répétés de la solution à travers une pipette. Un aliquote (900µL) est

ajouté à un liquide de scintillation (Rotiszint®, 4 ml). Le reste de la solution est prélevé pour effectuer un dosage des protéines selon la méthode de BCA (Uptima). La quantité de radioactivité mesurée par le compteur à scintillation est convertie grâce à un étalonnage approprié, en picomoles de XA capturée par les cellules/mg de protéines.

On effectue la même manipulation pour chacune des boîtes contenant les cellules différenciées. Toutefois, à chaque expérimentation, un des paramètres est modifié afin de déterminer les caractéristiques cinétiques et pharmacologiques du transport de XA dans les cellules NCB-20.

Les conditions de transport sont mesurées en fonction :

➤ Du temps d'incubation:

Ces expériences permettent de définir la cinétique du transport du XA. Pour chaque durée d'incubation choisie, on réalise la mesure du transport sur 9 boîtes de cellules NCB-20 avec  $\text{Na}^+$  et sans  $\text{Na}^+$ . Dix temps différents sont choisis: 0-10-30 secondes et 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12 minutes. Quatre expériences différentes ont été réalisées.

➤ De la concentration en [ $^3\text{H}$ ]XA :

Cette expérimentation permet de définir les paramètres cinétiques que sont la vitesse maximum du transport ( $V_m$ ) et la concentration de XA nécessaire pour obtenir la moitié de cette vitesse maximum ( $K_m$ ).

Pour chaque concentration de XA, on réalise la mesure de son transport sur 9 boîtes de cellules NCB-20 avec  $\text{Na}^+$  et 9 sans  $\text{Na}^+$ . Sept concentrations différentes sont choisies: 1-5-12,5-25-50-100-200  $\mu\text{M}$ . Quatre expériences distinctes ont été réalisées.

### *DOSAGE DES PROTEINES*

- Le dosage des protéines est réalisé en microplaque. La microplaque doit contenir le
- 5 nombre de puits nécessaire pour effectuer le dosage en double pour chaque boîte de culture et pour la gamme d'étalonnage.
- Les cellules contenues dans le fond de chaque boîte de culture traitée est repris par 1 ml d'eau bi-distillée. Après plusieurs aspiration-refoulements pour décoller tous les débris cellulaires et homogénéiser la suspension. Deux prises d'essai de 20 µl
- 10 en sont ensuite prélevées et déposées dans les puits de la microplaque.
- Un espace est réservé pour la gamme de calibration comprise entre 0,032 et 2 mg/ml. Chaque suspension de débris cellulaire est mesurée en double. 200 µl de réactif (mélange de 50 parties du réactif A et d'une partie du réactif B) sont ensuite ajoutés dans chaque puits. Après agitation la plaque est mise à incuber 30 min à 37
- 15 °C.

### *COMPTAGE DE LA RADIOACTIVITE*

- 4 ml de scintillateur sont ajoutés dans les tubes contenant 900 µl de la suspension
- 20 cellulaire obtenue. Le tube témoin est réalisé avec 900 µl d'eau bi-distillée, et les tubes permettant la mesure de l'activité spécifique contiennent 10 µl des solutions radioactives utilisées comme réactif lors de la manipulation et 890 µl d'eau bidistillée. Les tubes sont fermés, vortexés puis laissés une nuit à 4°C avant d'être mesurées dans le compteur à scintillation. Ce comptage permet de mesurer la
- 25 quantité de radioactivité intracellulaire qui est directement proportionnelle à la quantité de XA incorporé dans la cellule par transport passif ou actif. Pour obtenir la quantité de transport actif, il suffit de soustraire au transport total (Krebs avec Na<sup>+</sup>) le transport passif (Krebs sans Na<sup>+</sup>).

## 2) Résultats concernant le transport de XA

La totalité des calculs a été réalisée par ordinateur à l'aide du programme Excel. Les résultats sont alors traduits sous forme graphique à l'aide d'un autre  
5 programme Prism 3.0 qui nous permet également le calcul des équations de droite et des statistiques.

Les résultats sur le transport de XA dans les cellules NCB-20 en fonction du temps sont donnés figure 32.

10

Lors de l'étude du transport en fonction du temps d'incubation des cellules en présence de XA, on peut observer que les trois courbes ont une allure similaire. Le transport est augmenté d'environ 20% en présence de sodium. Les 3 courbes saturent à partir d'1 minute environ, ce qui nous permet de définir le temps optimum  
15 de mesure du transport du XA dans les cellules NCB-20. Pour la suite des expériences, ce temps de 1 minute sera utilisé.

Les résultats du transport de XA dans les cellules NCB-20 en fonction de la concentration en [ $^3\text{H}$ ]XA sont donnés à la figure 33.

20 La représentation de Scatchard permet de déterminer les paramètres mathématiques du transport intracellulaire de XA soit un Km de 105  $\mu\text{M}$  et une Vmax de 1229 pmoles/mg protéine/ minute.

Lors de l'étude du transport de XA en fonction de la concentration de XA, on met en  
25 évidence une saturation du transport et donc du transporteur qui mathématiquement se traduit par la valeur de la vitesse maximale de transport. Dans nos expériences, cette donnée est de  $V_{\text{max}} = 1229 \pm 440$  pmoles/mg protéines . min. Une autre donnée mathématique caractéristique du transport est le Km qui représente la concentration de XA nécessaire pour une vitesse équivalente

à la moitié de la vitesse maximale. Dans nos expérimentations, le  $K_m$  est de  $105 \pm 81 \mu M$ .

La concentration optimale en XA pour l'étude pharmacologique de cette molécule sera de  $100 \mu M$ , ce qui correspond au  $K_m$  qui a été déterminé.

5

#### Interférence du transport de XA avec d'autres molécules endogènes

D'autres molécules endogènes, susceptibles d'être transportées par le transporteur XA, ont été testées. De plus, pour mettre en évidence le caractère énergie-  
10 dépendant de ce transport, nous avons bloqué la production d'énergie cellulaire par le deoxyglucose qui inhibe la glycolyse. Les résultats figurent sur l'histogramme de la figure 34, en pourcentage de capture par référence au transport en présence de XA radioactif seul (=100 %).

15 Il s'avère que le L-tryptophane, la L-tyrosine et l'acide kynurénique sont de bons inhibiteurs du transport cellulaire du XA. Il peut donc être envisagé que la capture neuronale de XA emprunte le transporteur d'acides aminés neutres. La présence d'ions cuivre ou d'ions zinc dans le milieu potentialise de façon très significative le transport de XA (trois fois plus pour les ions cuivre). La présence du poison  
20 cellulaire 2-deoxyglucose diminue le transport d'environ 50%, ce qui indique que ce transport nécessite une énergie cellulaire intacte.

### **3) Conclusions aux expériences de transport de XA**

25 Les différentes expériences réalisées ont permis de mettre en évidence la présence d'un transport actif de XA dans les cellules NCB-20. Ce transport est un phénomène actif qui nécessite la présence d'ions sodium dans le milieu réactionnel. Ce transport se caractérise par une cinétique assez rapide puisque la vitesse optimum se situe aux environs de 1 minute d'incubation. Les paramètres cinétiques  
30 de ce transport actif ont été mesurés et comportent une vitesse maximum de 1229

pmoles/mg protéines.min et un Km de 105  $\mu$ M. Un certain nombre d'acides aminés, dont le tryptophane et la tyrosine, inhibe ce transport, ce qui suggère que le transporteur impliqué pourrait être un transporteur neuronal pour les acides aminés neutres et que le transport de XA interfère avec le transport d'acides aminés essentiels pour la synthèse des catécholamines et de la sérotonine. Les composés synthétiques, ligands du récepteur XA, pourront être testés sur ce transporteur pour vérifier leurs spécificités.

## 9. Organisation et rôle du système XA dans la régulation de l'activité dopaminergique.

1) Le XA est-il co-libéré avec la dopamine au niveau des mêmes terminaisons lors de la stimulation des noyaux dopaminergiques  $A_9$ - $A_{10}$  ?

Pour répondre à cette question, on a étudié les modifications de la libération de dopamine et de XA extracellulaire après lésion des noyaux dopaminergiques à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Cette lésion détruit en particulier les terminaisons dopaminergiques du cortex frontal. On a, d'autre part exploré les modifications de libération de glutamate et de GABA sous l'influence de XA pour essayer de comprendre la séquence des événements menant à la modification de libération de la dopamine au niveau frontal chez le rat.

### Protocole utilisé :

La voie dopaminergique mésencéphalique a été lésée de façon unilatérale par injection stéréotaxique de 6-hydroxydopamine hydrobromide (6-OHDA Hbr, Sigma) dans l'aire tegmentale ventrale (VTA) et dans la substance noire compacte (SNc). L'intervention a été pratiquée dans un cadre stéréotaxique (Narishige) sur des rats de souche Wistar sous anesthésie (Imalgène 100 mg / kg i.p.). La neurotoxine (6-OHDA) a été dissoute dans une solution de chlorure de sodium isotonique (NaCl

- 0.9%) contenant 0.01% d'acide ascorbique à une concentration finale de 4µg de base libre / µl et 6 µg (1.5 µl / point d'injection) ont été injectés en deux minutes en utilisant une canule d'injection en acier inox de diamètre 20 G. En accord avec l'atlas de Paxinos et Watson, les coordonnées stéréotaxiques utilisées sont
- 5 exprimées en millimètres par rapport au bregma : AP : 2.3 ; ML : 0.5 ; DV : 8.7 mm et AP : 2.3 ; ML : 2.0 ; DV : 7.5 mm, respectivement pour le VTA et la SNc. La coordonnée dorso-ventrale a été prise à partir de l'os crânien, les barres d'oreilles étant positionnées à 3,3 mm en dessous de la barre des incisives supérieures. Après l'injection totale du volume à la vitesse de 1µl / minute (pompe CMA 100)
- 10 l'aiguille d'injection est restée en place une minute supplémentaire, afin de laisser s'effectuer la libre diffusion de la toxine autour du point d'injection. Les neurones noradrénergiques ont été protégés de cette lésion par une injection préalable de désipramine à raison de 25 mg / kg i.p. au temps 45 minutes avant l'injection de 6-OHDA.

15

#### Sélection des animaux

- Quatre semaines après la lésion, les rats ont été testés après administration sous-cutanée d'un agoniste direct (apomorphine 0,1 et 1,0 mg / kg) et le nombre de
- 20 rotations controlatérales (côté opposé à la lésion) a été enregistré pendant 15 minutes. Pour les rats lésés, le résultat a été le suivant :  $130 \pm 45$  tours / 15 minutes. (n = 12 animaux).

- Six semaines après les injections dans l'aire tegmentaire ventrale et la substance
- 25 noire compacte droites, les rats ayant donné satisfaction au comportement de rotations controlatérales induites par l'apomorphine ont été sélectionnés et implantés pour effectuer les expériences de microdialyse.

- A la fin des expériences, les animaux utilisés ont été euthanasiés. Le striatum et la région des noyaux mésencéphaliques ipsilatérale et controlatérale ont été prélevés
- 30 et analysés par HPLC pour leur teneur résiduelle en dopamine.

Les résultats exprimés en pmoles / g de tissu frais  $\pm$  SEM (n=3) ont été les suivants :

- 5 Striatum lésé :  $261 \pm 123$  versus striatum intact  $9140 \pm 1413$  (- 98% p = 0.0033)  
VTA - SNc lésé :  $32 \pm 31$  versus VTA - SNc intact  $563 \pm 128$  (- 95% p = 0.0157).

- Ceci indique que la lésion des neurones dopaminergiques a été satisfaisante et qu'on observe une chute très importante de la teneur en dopamine du striatum et  
10 des noyaux dopaminergiques.

Mesure de la libération extracellulaire de la dopamine et de ses métabolites après lésion neurotoxique des noyaux dopaminergiques mésencéphaliques :

15

Les animaux lésés ont été implantés (sonde de dialyse et électrode bipolaire), stimulés électriquement au niveau du VTA (100 et 200  $\mu$ A) et dialysés au niveau du cortex préfrontal / cingulaire antérieur suivant le même protocole que celui déjà décrit dans les expériences précédentes.

20

Parmi les paramètres mesurés (DA, DOPAC, HVA, XA et 5-HIAA), seuls le XA et le 5-HIAA ont été détectables sur les chromatogrammes.

25

Les résultats obtenus montrent que la stimulation électrique (100 et 200  $\mu$ A) du VTA après lésion à la 6-OHDA des noyaux dopaminergiques (VTA et SNc) a pour conséquence de provoquer une libération frontale de XA (+ 151  $\pm$  51% et + 667  $\pm$  115% pour respectivement une stimulation de 100  $\mu$ ampères et 200  $\mu$ ampères), accompagnée d'une libération de 5-HIAA sans modification du niveau de la libération de dopamine résiduelle après la lésion (DA, DOPAC et HVA).

30

Ces résultats démontrent que XA et dopamine ne sont pas co-libérés au niveau frontal, alors que le XA module la libération de dopamine. XA est donc libéré par des terminaisons probablement spécifiques et module la libération de dopamine via des récepteurs localisés au niveau des extrémités dopaminergiques, soit au niveau  
5 des noyaux dopaminergiques eux-mêmes (VTA et SNc), soit enfin au niveau de terminaisons contrôlant la libération de glutamate et/ou de GABA dans le cortex frontal. Les autoradiographies quantitatives ont montré l'existence de sites de fixation à haute affinité pour le XA, aussi bien dans le cortex frontal qu'au niveau des noyaux dopaminergiques du mésencéphale.

10

**2) Modification de la libération extracellulaire frontale en glutamate (GLU) et en GABA après rétrodialyse de XA 20  $\mu$ M pendant 20 minutes**

15

L'objectif est ici de mettre en évidence une éventuelle modification de la libération de glutamate et / ou de GABA par le XA. Ces modifications auraient ensuite une répercussion sur la libération de dopamine. Dans cette hypothèse, les sites récepteurs XA se trouveraient situés sur des neurones glutamate et / ou GABA du  
20 cortex frontal.

**a) Mesure des concentrations en acides aminés libres dans les dialysats**

Les acides aminés contenus dans 15  $\mu$ l de dialysat ont été séparés en fonction de  
25 leur degré d'hydrophobicité par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse. Ce système comprend un dégazeur (Waters In-Line Degasser), une pompe (Waters 626 Pump, Waters 600 S Controller), un collecteur-injecteur CMA/200 réfrigéré (Refrigerated Microsampler, CMA/microdialysis, Carnegie) muni d'une boucle de 51  $\mu$ l, une colonne nucleosil C18 (5  $\mu$ m, 25 x 0,4 cm), un four  
30 (Waters), et un fluorimètre (Waters 470 scanning fluorescence detector). La phase

mobile était constituée d'un gradient binaire entre une solution A :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Roth) 0,05 M 80% (pH 4.8 ajusté avec du NaOH 10 N), méthanol 20% (Chromanorm, Prolabo); et une solution B :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,05 M 20% (pH 4.8 ajusté avec du NaOH 10 N), méthanol 80% et THF 5%. La mesure du glutamate et du GABA a été effectuée  
5 par détection fluorimétrique à 345 nm de longueur d'onde d'excitation et 455 nm de longueur d'onde d'émission après dérivatisation. L'acquisition des chromatogrammes ainsi que l'analyse quantitative des données ont été réalisées à l'aide du logiciel Millénium (Waters).

La dérivatisation des échantillons a été faite par mélange de 15  $\mu\text{l}$  de dialysat avec  
10 un volume de 15  $\mu\text{l}$  de la solution de dérivatisation suivante : 7,5 mg d'ophthalmaldéhyde (Sigma) dans 4,5 ml de tetraborate de Na 0,1 M pH 9.3, 500  $\mu\text{l}$  de méthanol et 10  $\mu\text{l}$  d'acide 3-mercaptopropionique (Sigma). L'élution a été fixée à 0,8 ml/min et 35°C suivant une succession d'étapes : 90% A et 10% B à 0 min; 40% A et 60% B à 15 min (gradient linéaire); 40% A et 60% B à 19 min (gradient  
15 isocratique); 0% A et 100% B à 19,1 min; 0% A et 100% B à 24 min (gradient isocratique); 90% A et 10% B à 24,1 min (gradient isocratique) et 90% A et 10% B à 30 min. La limite de détection pour le glutamate et le GABA dans nos échantillons a été de 0,75 fmoles (0,05  $\mu\text{M}$ ). L'acide  $\beta$ -amino-isobutyrique (Sigma) a été utilisé comme standard interne.

20

Résultats obtenus :

La rétrodialyse de 20  $\mu\text{M}$  de XA pendant 20 minutes au niveau du cortex frontal a pour conséquence de provoquer une baisse immédiate de la libération de GLU de  
25 37%  $\pm$  1 pendant une durée de 90 minutes avant un retour progressif au niveau de base. Les résultats présentés en figures 35 et 36 sont exprimés en %  $\pm$  SEM (n=2). La valeur 100 % (1nmole / 20  $\mu\text{l}$ ) représente la moyenne de 4 échantillons consécutifs avant stimulation.

30

**10. Répercussion de l'effet du stress induit par des chocs électriques intermittents sur la libération de noradrénaline (NE) et de XA au niveau du cortex préfrontal médian (CPF).**

- 5** Ce travail repose sur l'hypothèse que la noradrénaline (NE) préfrontale provenant du locus coeruleus (A6) joue un rôle important dans les différences comportementales individuelles de réactivité au stress. Le noyau A6 présentant un marquage de XA tritié sur les autoradiographies, nous avons voulu voir si la libération frontale de XA pouvait être impliquée dans les mécanismes de stress
- 10** induit par chocs électriques chez l'animal.
- L'activité locomotrice spontanée dans un nouvel environnement étant un indice comportemental de réactivité vis-à-vis d'une situation stressante, nous avons sélectionné des « animaux répondeurs » qui avaient une réponse comportementale plus importante dans ce test.
- 15** Les principales composantes de la réponse au stress étant la libération extra-hypothalamique de CRH (corticotropine releasing hormone) provoquant une stimulation de la tyrosine hydroxylase (TH) entraînant une augmentation de la noradrénaline au niveau du locus coeruleus et par conséquent une augmentation de la libération de NE au niveau des terminales (cortex préfrontal, l'amygdale et
- 20** gyrus denté).

**Protocole utilisé:**

- 1) Sélection des animaux dans l'épreuve du « champ ouvert » :**
- 25** Nombre de carreaux franchis dans une session de 5 minutes :  $55.08 \pm 22.6$  (6.53)
- Moyenne  $\pm$  SD (SEM) n = 12 rats de 350 g. de souche Wistar.

**2) Stress et quantification neurochimique :**

- Le stress a été induit par des chocs électriques intermittents au niveau des pattes à
- 30** raison de 1 choc de 0,3 mA / min pendant 20 minutes.

La libération de noradrénaline au niveau du cortex préfrontal a été mesurée en utilisant la technique de microdialyse intracérébrale sur animal vigile couplée à un système de chromatographie liquide à haute performance à détection électrochimique.

5

Résultats :

Les résultats sont donnés à la figure 37.

Pendant la durée du stress induit par des chocs électriques intermittents de 300  $\mu$ A d'une durée de 1 seconde / min, pendant 20 min, la noradrénaline préfrontale a augmenté de +151 % par rapport à sa libération basale et celle du XA de +250 %.

10

Cette étude montre que la noradrénaline et XA sont libérés simultanément dans le cortex frontal de l'animal stressé. Le XA libéré peut représenter une réaction d'adaptation au stress et l'administration d'agonistes du récepteur XA dans des situations de stress pourrait représenter une nouvelle solution thérapeutique, d'autant plus que la dopamine libérée est très faible et que le XA et les agonistes du récepteur XA augmente cette libération.

15

## 20      **11. Caractérisations neuropharmacologiques des activités antagonistes au niveau du récepteur XA : étude d'un antagoniste intitulé NCS-486.**

### **1) Etude des stéréotypies dopaminergiques induites par l'injection intracérébrale de XA et réversion par un antagoniste NCS-486.**

25

Les « stéréotypies » sont des mouvements involontaires effectués par l'animal après administration d'agonistes dopaminergiques directs (apomorphine) ou indirects (amphétamine).

Ces comportements stéréotypés sont les suivants : léchages, mâchonnements, hyperlocomotion, exploration, redressements, toilettages, enfouissements, étirements et reniflements.

## 5 Effets de l'acide xanthurénique

Les injections intracérébrales de XA au niveau du striatum, du VTA, des ventricules latéraux ou du noyau accumbens, induisent des stéréotypies dont l'intensité est proportionnelle à la dose injectée (2, 10, 50, 100 et 150 µg / rat). Ces

- 10 comportements apparaissent deux minutes après injection intracérébrale et durent entre 30 et 40 minutes. Une heure après la disparition de celles-ci, ces stéréotypies peuvent être reproduites par une nouvelle injection.

Après lésion neurotoxique des noyaux mésencéphaliques (A<sub>9</sub>-A<sub>10</sub>) à la 6-OHDA, l'injection de 25 mg / kg (i.p.) de XA ne modifie pas le nombre de rotations

- 15 controlatérales induites par 0.1 mg / kg (s.c.) d'apomorphine. De la même manière, 25 mg / kg de XA ne modifie pas le nombre de rotations ipsilatérales induites par l'administration d'amphétamine.

Effets du NCS-486 sur les stéréotypies induites par le XA, l'apomorphine ou

- 20 l'amphétamine :

2 µg/rat (i.c.v.) de NCS-486 antagonisent totalement les stéréotypies induites par 2 µg de XA (i.c.v.), alors que l'injection de NCS-486 seule (2 µg i.c.v.) ne modifie nullement le comportement de l'animal.

- 25 Injecté (i.p) ou (i.c.v.) le NCS-486 n'antagonise pas les stéréotypies induites par 0.5 mg / kg (s.c) d'apomorphine. Par contre, le NCS-486, à la dose de 200 mg / kg i.p, injecté 30 minutes avant le XA 2 µg / rat i.c.v. supprime ou réduit fortement l'apparition des stéréotypies.

## 2) Etude du NCS-486 sur l'activité générale de l'animal mesurée dans le test de « l'openfield » et réversion de la sédation induite par le XA.

- 5 Cette étude a montré qu'une heure après administration du NCS-486 (100 mg / kg p.o) celui-ci provoquait une hyperactivité de l'animal. De plus, le NCS-486 était capable d'antagoniser la sédation induite par une injection de 100 mg / kg (i.p.) de XA.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

Items	Témoins	Traités NCS-486	Variations en %
Toilettages	1 ± 1	3 ± 1	-
Sauts	1 ± 2	2 ± 2	-
Redressements	20 ± 14	32 ± 1	-
Carreaux totaux	55 ± 37	143 ± 2 **	+ 260
Carreaux externes	51 ± 33	128 ± 21*	+ 251
Carreaux internes	4 ± 4	14 ± 1*	+ 350
Défécations	2 ± 1	0	-

10

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SD (n=4 rats / groupe)

Test de Student : \* p < 0.05 ; \*\* p < 0.01

- 15 Recherche d'une réversion de la sédation induite par l'administration de XA 100 mg / kg (i.p)

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

Items	Témoins	XA 100 mg/kg (i.p.)	XA 100 mg/kg (i.p.) + ND-7002 100 mg/kg (per os)
Toilettages	4 ± 1	4 ± 2	4 ± 1
Redressements	66 ± 4	37 ± 14	51 ± 11
Carreaux totaux	193 ± 22	110 ± 25 *	182 ± 15
Carreaux externes	153 ± 18	91 ± 17*	148 ± 15
Carreaux internes	39 ± 9	19 ± 6	34 ± 8

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM (n=4 rats / groupe).

Test de Student : \*  $p < 0.05$

- 12. Caractérisations des activités neuropharmacologiques de ligands se fixant sur le site allostérique pour l'acide kynurénique, partie intégrante du site récepteur de XA : exemple d'un composé, intitulé ND-7000, dérivé de l'acide xanthurénique ou de l'acide kynurénique.**

Effets du ND-7000 sur les stéréotypies induites par le XA.

10

Le ND-7000 injecté par voie intra-cérébroventriculaire à la dose de 20  $\mu\text{g}$  / rat, n'induit aucune stéréotypie chez l'animal. A la dose de 50  $\mu\text{g}$ /animal, le ND-7000 fait apparaître une sédation importante. En revanche, une injection simultanée de 10  $\mu\text{g}$  de ND-7000 et de 10  $\mu\text{g}$  de XA fait apparaître des stéréotypies. Une dose de 25  $\mu\text{g}$  de ND-7000 + 25  $\mu\text{g}$  de XA potentialise très nettement les stéréotypies (toilettes) et diminue le temps de latence d'apparition de ces mouvements involontaires (2 min au lieu de 5 min).

- 20 Etude du ND-7000 sur l'activité générale de l'animal dans le test de « l'openfield »**

Le test, d'une durée d'observation de 15 minutes, a été effectué 30 minutes après injection du produit à la dose de 100 ou 200 mg / kg (per os).

Aux deux doses étudiées nous observons une diminution de l'activité globale des animaux qui est proportionnelle à la dose de produit injecté.

25

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau suivant :

Items	Témoins	100 mg/kg (i.p.)	200 mg/kg (i.p.)
Toilettes	5 $\pm$ 4	3 $\pm$ 2	4 $\pm$ 2

Redressements	53 ± 12	30 ± 6 (-44%)	20 ± 9 (-63%)
Carreaux totaux	215 ± 24	146 ± 15 (-33%)	106 ± 22 (-51%)
Carreaux externes	188 ± 35	129 ± 11 (-32%)	97 ± 23 (-49%)
Carreaux internes	27 ± 13	17 ± 8 (-38%)	9 ± 7 (-68%)

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SD (n=5 rats/groupe).

Administré à la dose de 100 à 200 mg / kg (per os), le ND-7000 n'induit pas de catalepsie et ne modifie pas les activités réflexes mesurées dans des tests sensori-moteurs.

L'actographie obtenue avec administration de ND-7000 à 100 mg / kg per os (PO) est représentée à la figure 38.

10

En conclusion, les effets de ND-7000 sur les activités dopaminergiques cérébrales induite par XA et sur la réactivité globale de l'animal mesurée dans l'open-field, sont en faveur de la potentialisation par ce produit de la fixation de XA sur son site récepteur. Ces résultats confirment les études de binding qui montraient une forte augmentation de la fixation de XA sur son site récepteur en présence de ND-7000.

15

Ces expériences confirment au niveau pharmacologique, l'existence d'une autre voie pour potentialiser les effets de Xa. Il s'agit des ligands synthétiques se fixant sur le site allostérique. On peut imaginer également des effecteurs allostériques négatifs, antagoniste du binding de ND-7000 et des dérivés de l'acide kynurénique, qui diminueraient l'activité de XA en diminuant sa fixation sur son site récepteur. Ceci représente une nouvelle voie de recherche pour la synthèse de ligands originaux.

20

25

**13. Un exemple de ligand agoniste du récepteur XA, dérivé de l'acide xanthurénique, intitulé le ND-1301**

Le ND-1301 a été choisi pour illustrer la série des ligands agonistes du récepteur XA. Cette substance déplace le XA radioactif de son site avec une bonne affinité et induit une forte réponse électrophysiologique après étude en patch-clamp sur des cellules NCB-20. Le ND-1301, administré per os à l'animal, module également les

5   taux de dopamine tissulaire cérébraux, comme l'indiquent les résultats ci-dessous.

L'effet dose/réponse après administration (P.O.) de ND-1301 sur la dopamine tissulaire dans différentes régions cérébrales est donné à la figure 39.

## REVENDICATIONS

1. Méthode de sélection, identification ou caractérisation de composés, comprenant la mise en contact in vitro ou ex vivo d'un composé test avec une cellule ou une  
5 préparation membranaire naturelle ou synthétique exprimant une molécule cible impliquée dans l'activité de l'acide xanthurénique, et la mise en évidence d'une liaison du composé test à ladite molécule.
2. Méthode selon la revendication 1, comprenant la mise en contact d'un composé  
10 test avec une cellule (ou une préparation membranaire naturelle ou synthétique) exprimant une molécule cible impliquée dans l'activité de l'acide xanthurénique, en présence d'un ligand marqué de ladite cible, et la mise en évidence d'une liaison du composé test par détermination du déplacement de la liaison du ligand marqué.
- 15 3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la molécule cible est le récepteur du XA, une enzyme de synthèse du XA, un transporteur du XA ou un fragment de ceux-ci.
4. Méthode selon la revendication 3, comprenant la mise en contact d'un composé  
20 test avec une cellule (ou une préparation membranaire naturelle ou synthétique) exprimant un récepteur à l'acide xanthurénique et la mise en évidence d'une liaison du composé test au récepteur.
5. Méthode de sélection, identification ou caractérisation de composés, comprenant  
25 la mise en contact d'un composé test avec une cellule exprimant une molécule cible impliquée dans l'activité de l'acide xanthurénique, et la mise en évidence d'un effet biologique ou pharmacologique caractéristique d'une liaison du composé test à ladite molécule cible.

6. Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'effet biologique ou pharmacologique mesuré est l'expression d'une ou plusieurs protéines cellulaires, l'expression d'un récepteur, l'activation d'un gène, l'internalisation du récepteur, l'apparition d'un courant électrique, d'un flux ou d'un influx d'ions.

5

7. Méthode selon la revendication 5 ou 6, comprenant la mise en contact d'un composé test avec une cellule exprimant un récepteur à l'acide xanthurénique, en présence d'un ligand dudit récepteur, la mesure d'un effet biologique ou pharmacologique caractéristique d'une liaison au récepteur XA et la

10 comparaison de l'effet mesuré à celui obtenu en l'absence de composé test.

8. Méthode de sélection, identification ou caractérisation de composés, comprenant :

- la mise en contact d'un composé test avec une molécule cible impliquée dans l'activité du XA, par exemple une enzyme de synthèse ou de
- 15 régulation, un transporteur, un récepteur, ou un fragment de ceux-ci, et
- la détermination de la liaison éventuelle dudit composé test sur ladite molécule.

20 9. Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que la liaison du composé test est mise en évidence par migration sur gel, électrophorèse, FRET SPA ou par détermination du déplacement d'un ligand marqué par le composé test.

25 10. Procédé de production d'un composé actif, notamment sur le système nerveux, le procédé comprenant :

- la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'activité de XA in vitro ou ex vivo, et
- la synthèse dudit composé ou d'un analogue structural de celui-ci.

30

11. Procédé de production d'un modulateur de XA, le procédé comprenant :
- la mise en contact d'un composé avec une molécule cible impliquée dans l'activation du XA,
  - la détermination d'un effet du composé sur la molécule cible, ledit effet indiquant que le composé est un modulateur de XA, et
  - la synthèse dudit composé ou d'un analogue structural de celui-ci.
12. Procédé de production d'un médicament comprenant un composé actif, notamment sur le système nerveux, le procédé comprenant :
- la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'activité de XA in vitro ou ex vivo, et
  - le mélange dudit composé ou d'un analogue structural de celui-ci avec un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.
13. Procédé de production d'un médicament comprenant un composé modulateur de XA, le procédé comprenant :
- la mise en contact d'un composé avec une molécule cible impliquée dans l'activation du XA,
  - la détermination d'un effet du composé sur la molécule cible, ledit effet indiquant que le composé est un modulateur de XA, et
  - le mélange dudit composé ou d'un analogue structural de celui-ci avec un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.
14. Utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies du système nerveux.
15. Utilisation selon la revendication 14, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de l'anxiété.

16. Utilisation selon la revendication 14, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de la dépression.
17. Utilisation selon la revendication 14, pour la préparation d'un médicament  
5 destiné au traitement de troubles de la mémoire ou des interactions sociales.
18. Utilisation selon la revendication 14, pour la préparation d'un médicament sédatif et/ou hypnotique.
- 10 19. Utilisation selon la revendication 14, pour la préparation d'un médicament destiné à moduler l'action dopaminergique.
20. Utilisation d'un composé modulant l'activité de l'acide xanthurénique pour la  
préparation d'un médicament destiné au traitement de maladies  
15 neurodégénératives, notamment de la maladie de Parkinson, d'Alzheimer ou de l'ALS, ou de maladies mentales, telles que la schizophrénie, ou encore de la dépendance à certaines drogues, notamment aux opiacées.

1/25

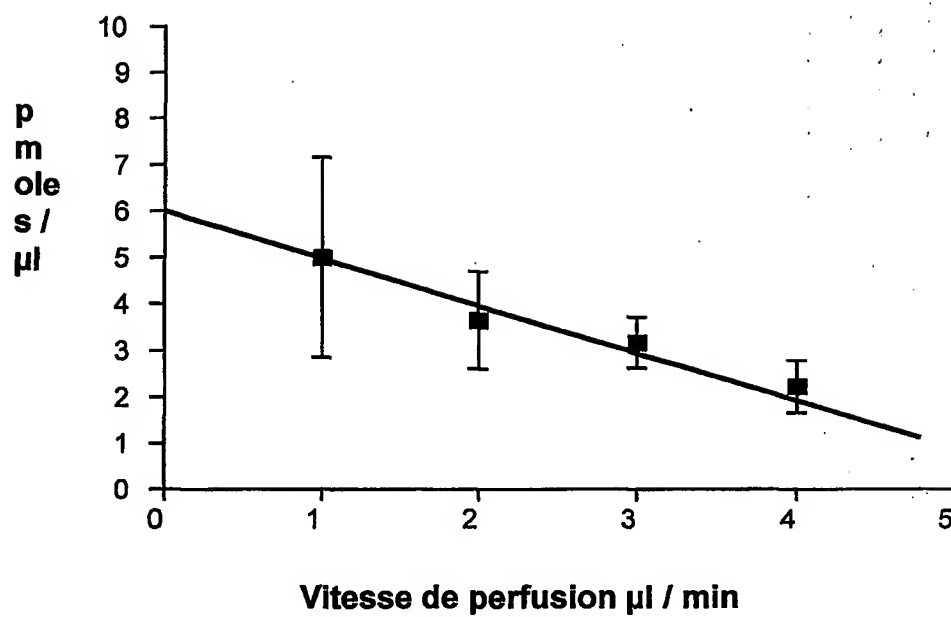


Figure 1

2/25

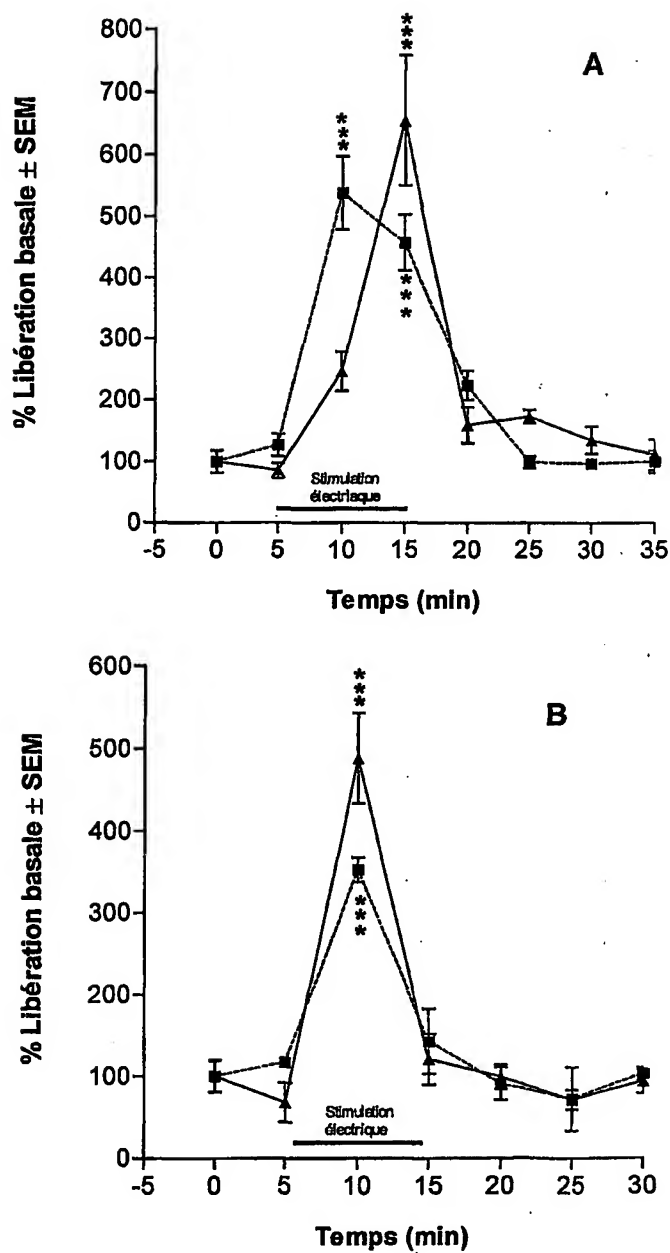


Figure 2A et 2B

3/25

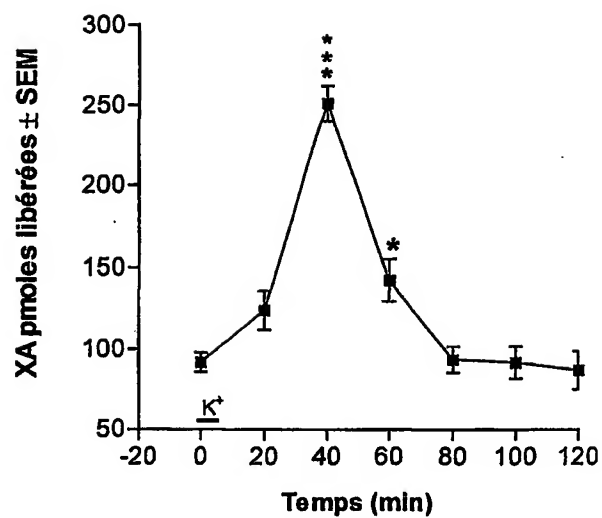


Figure 3

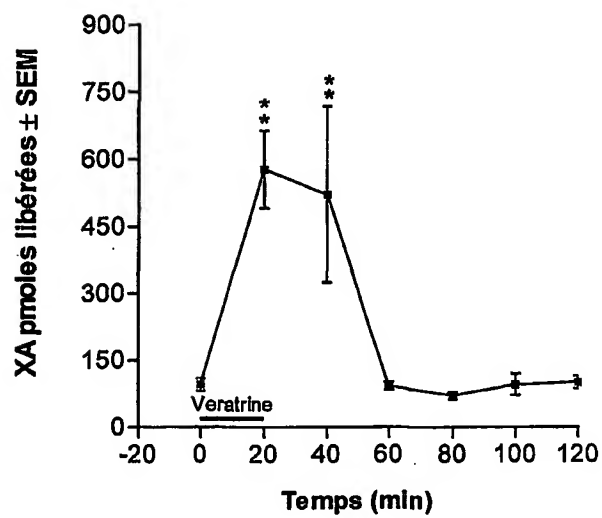


Figure 4

4/25

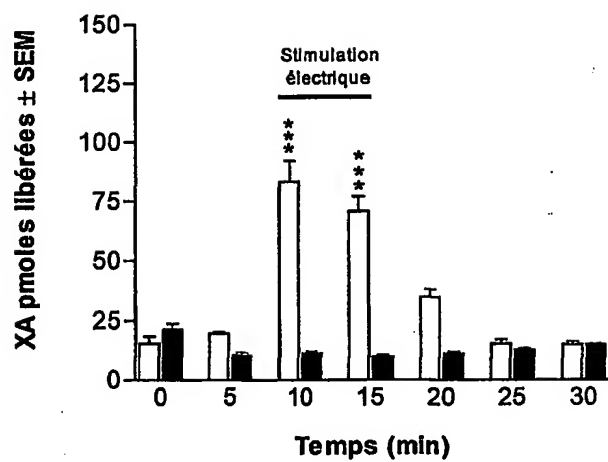


Figure 5

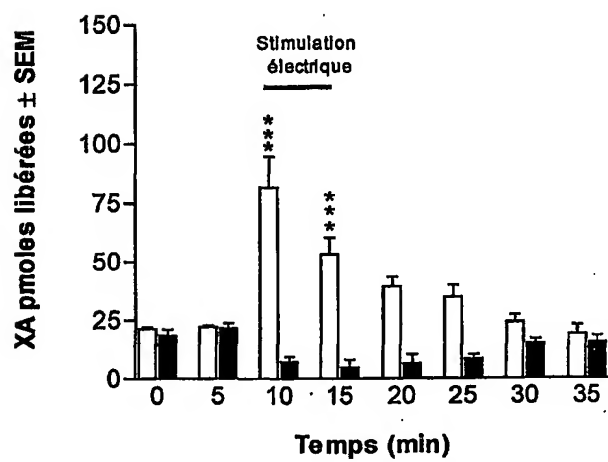


Figure 6

5/25

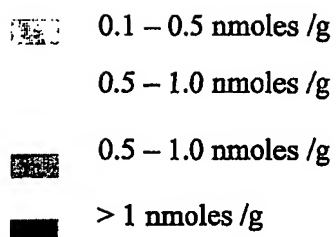
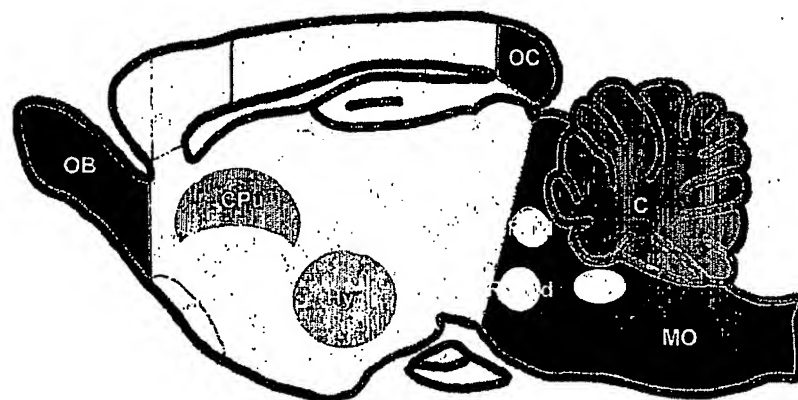


Figure 7

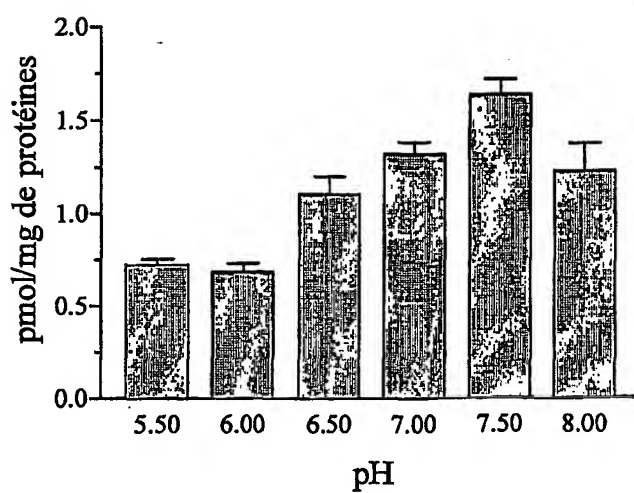


Figure 8

6/25

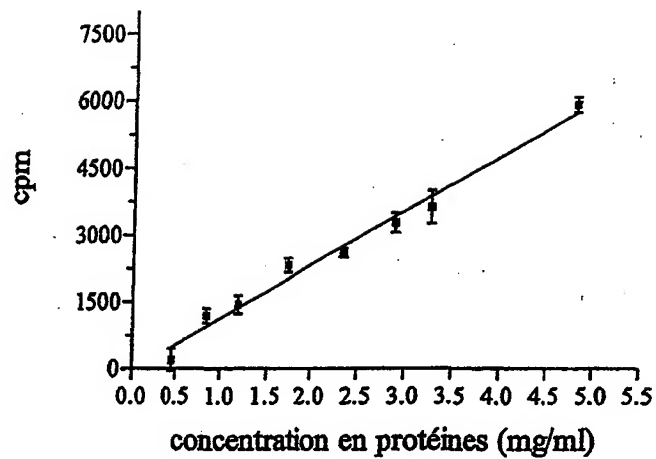
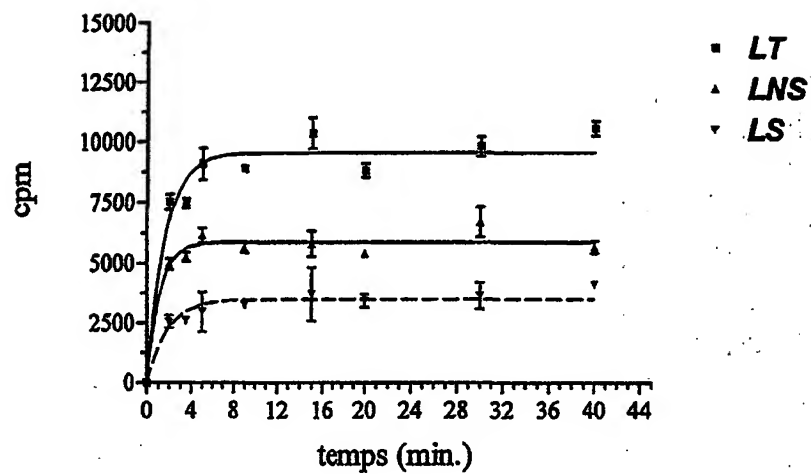


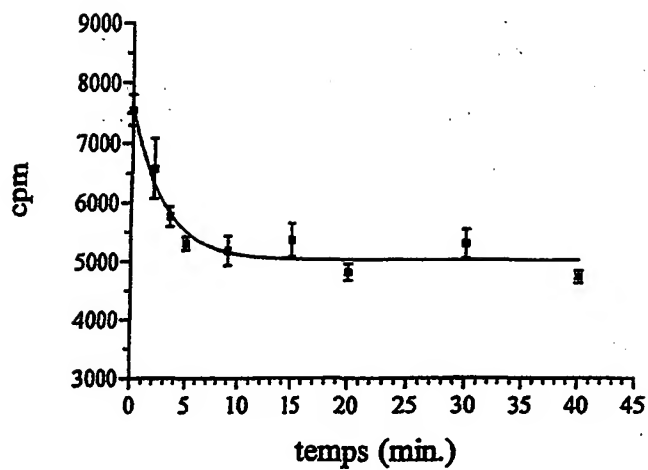
Figure 9



	LT	LNS	LS
YMAX	9564	5865	3482
K	0.6168	0.8860	0.5397
Demie-vie	1.124	0.7824	1.284
Std. Erreur			
YMAX	232.6	145.6	210.4
K	0.08527	0.1801	0.1675
Ajustement de courbe			
Degrés de liberté	24	25	19
R <sup>2</sup>	0.9225	0.9049	0.7541

FIGURE 10

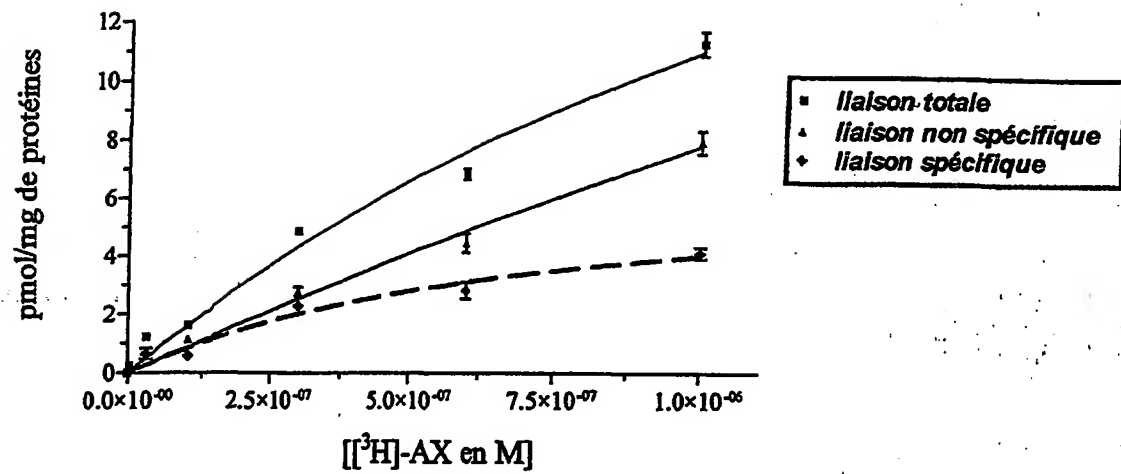
7/25



Valeurs ajustées	
SPAN	2571
K	0.3336
PLATEAU	5034
Demie-vie	2.078
Std. Erreur	
SPAN	273.5
K	0.07395
PLATEAU	126.7
Ajustement de courbe	
Degrés de liberté	31
R²	0.7468

Figure 11

8/25



	T	NS	S
BMAX	32.01	76.67	6.960
KD	1.9210e-006	8.8370e-006	7.4310e-007
Std. Erreur			
BMAX	7.059	76.23	1.237
KD	5.9230e-007	9.6130e-006	2.4980e-007
Ajustement de courbe			
Degrés de liberté	19	19	12
R <sup>2</sup>	0.9810	0.9779	0.9642

Figure 12

9/25

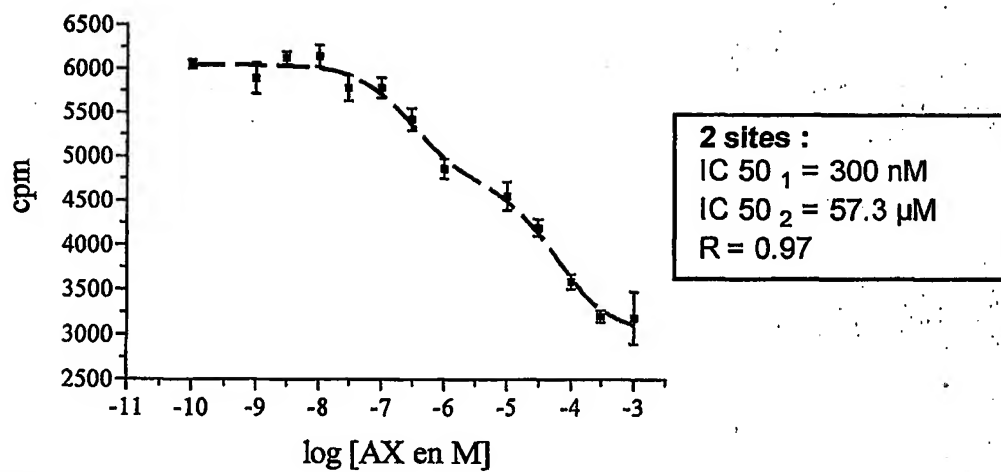


Figure 13

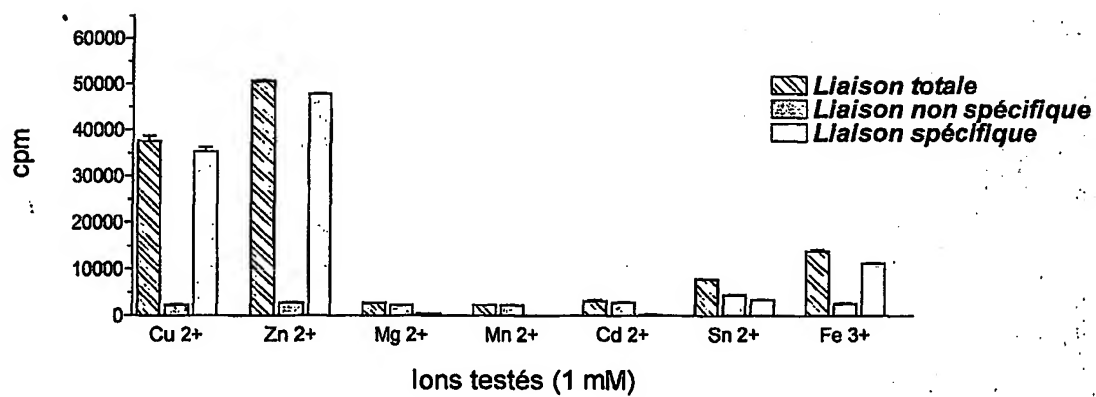


Figure 14

10/25

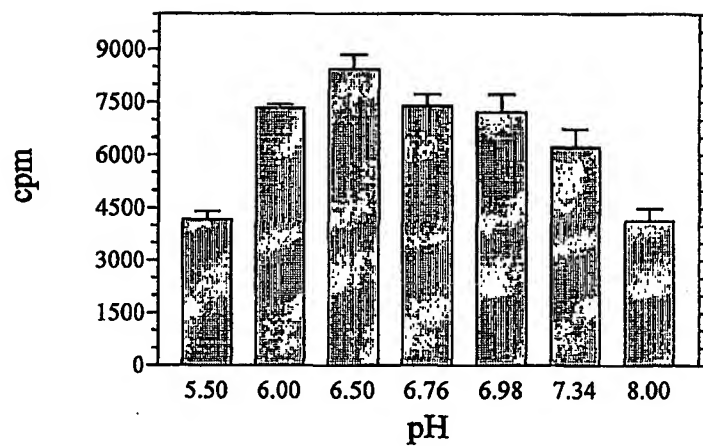


Figure 15

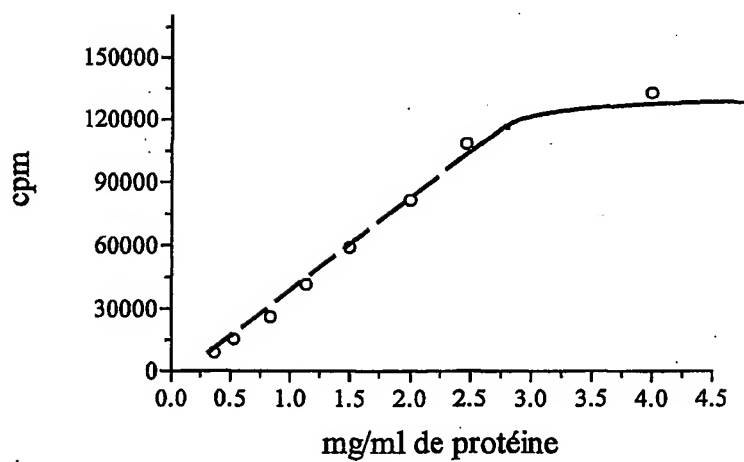


Figure 16

11/25

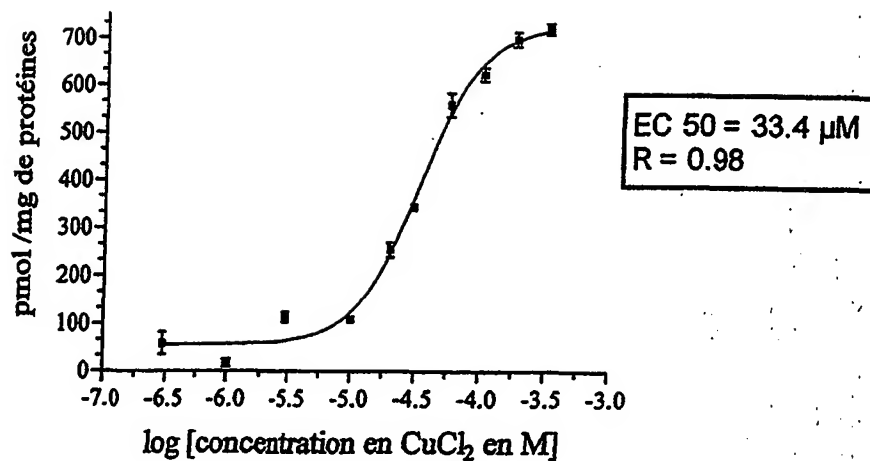
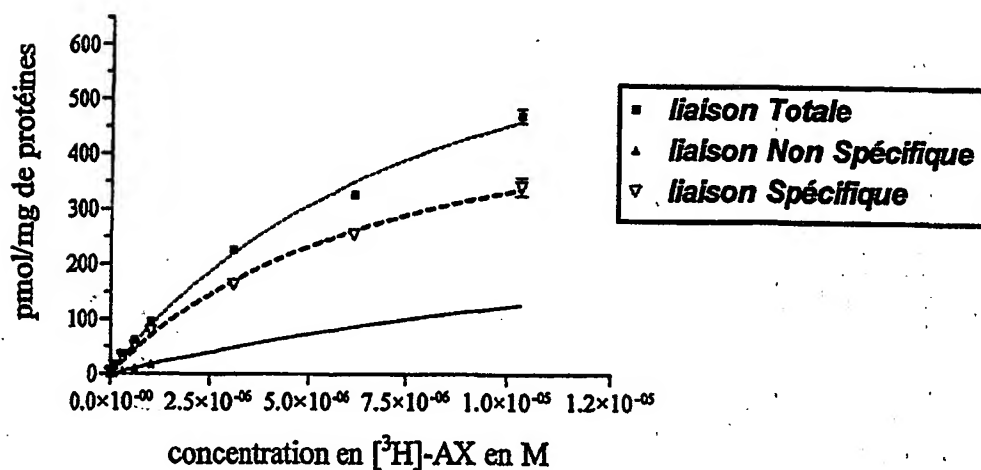


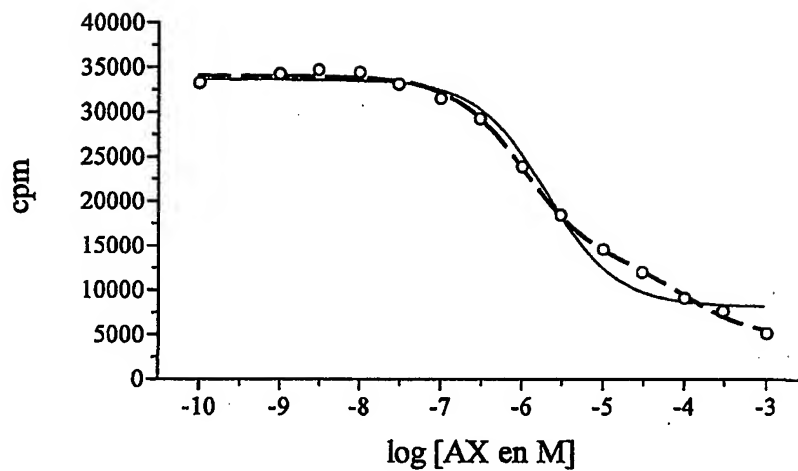
Figure 17



	T	NS	S
BMAX	867.9	410.6	581.8
KD	9.1610e-006	2.3220e-005	7.5600e-006
Std. Erreur			
BMAX	50.18	609.6	33.57
KD	9.3210e-007	3.5760e-005	8.2100e-007
Ajustement de courbe			
Degrés de liberté	25	16	25
R <sup>2</sup>	0.9942	0.9929	0.9922

Figure 18

12/25



1 site :  
IC 50 = 2  $\mu$ M  
R = 0.98

2 sites :  
IC 50<sub>1</sub> = 1.02  $\mu$ M  
IC 50<sub>2</sub> = 114.4  $\mu$ M  
R = 0.99

Figure 19

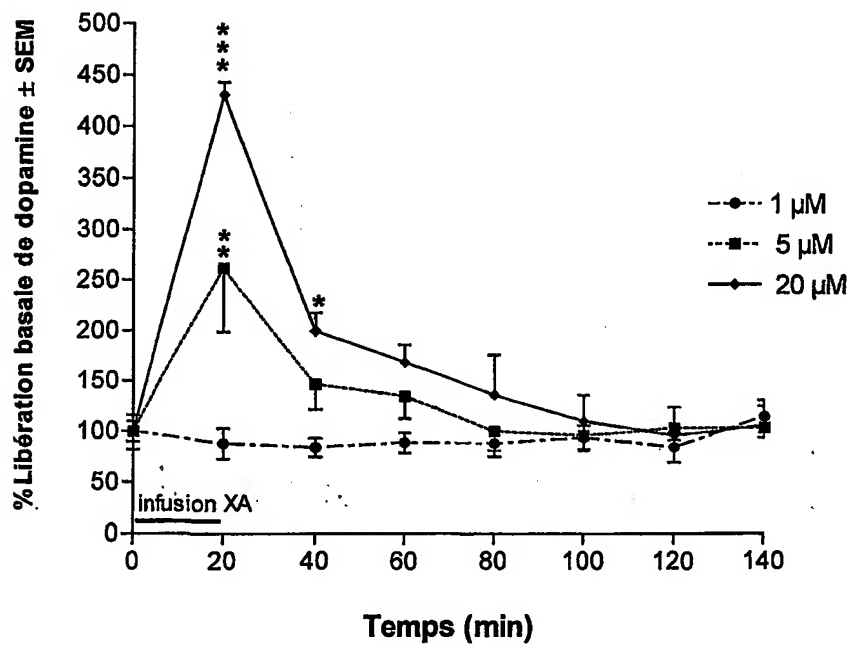


FIGURE 20

13/25

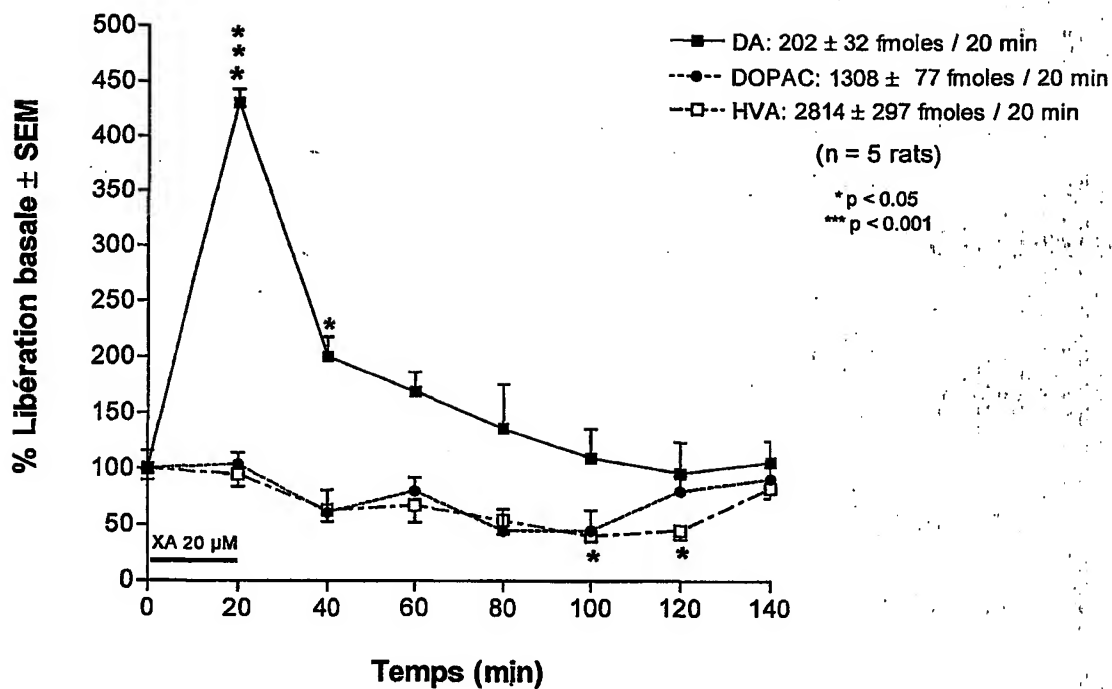


Figure 21

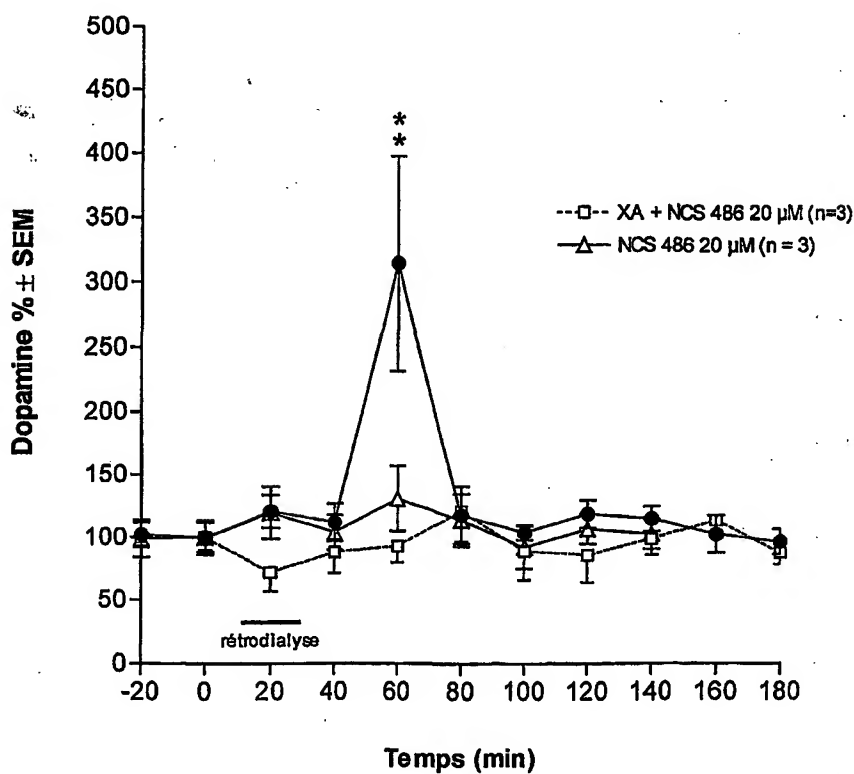


Figure 22

14/25

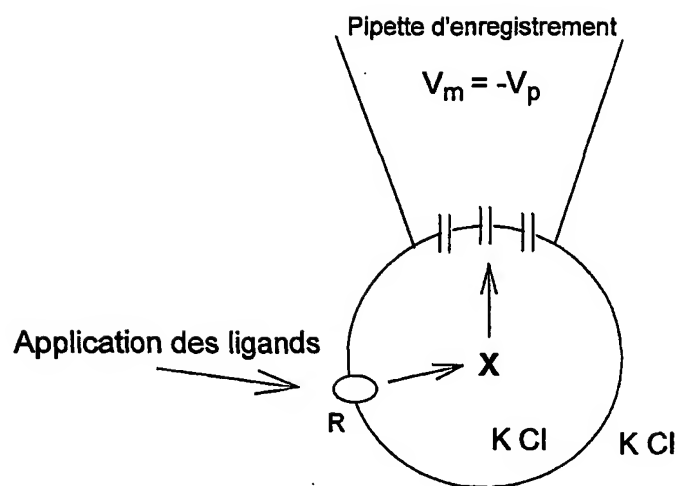


Figure 23

15/25

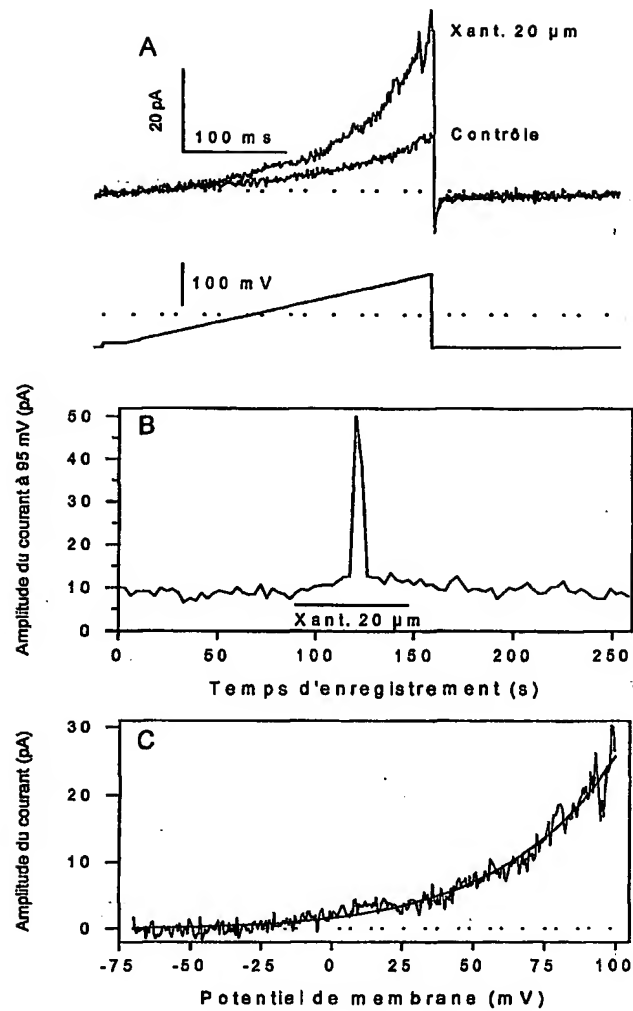


Figure 24

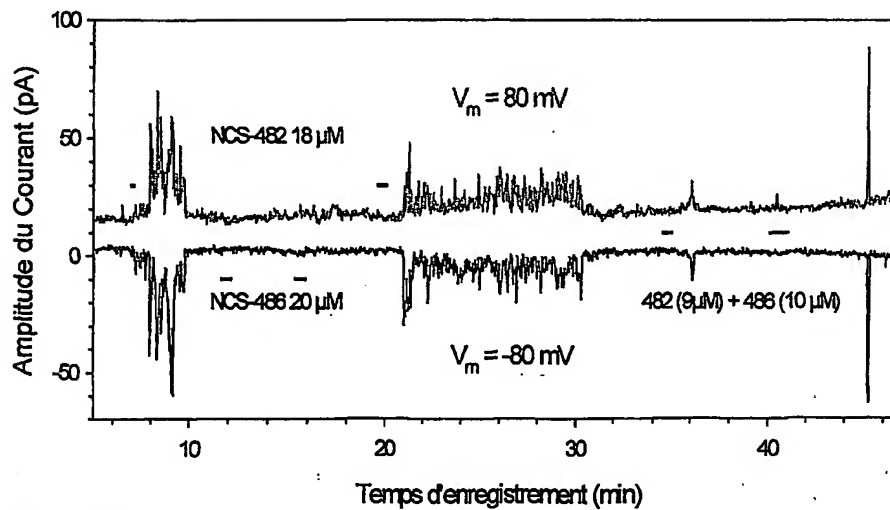


Figure 25.

16/25

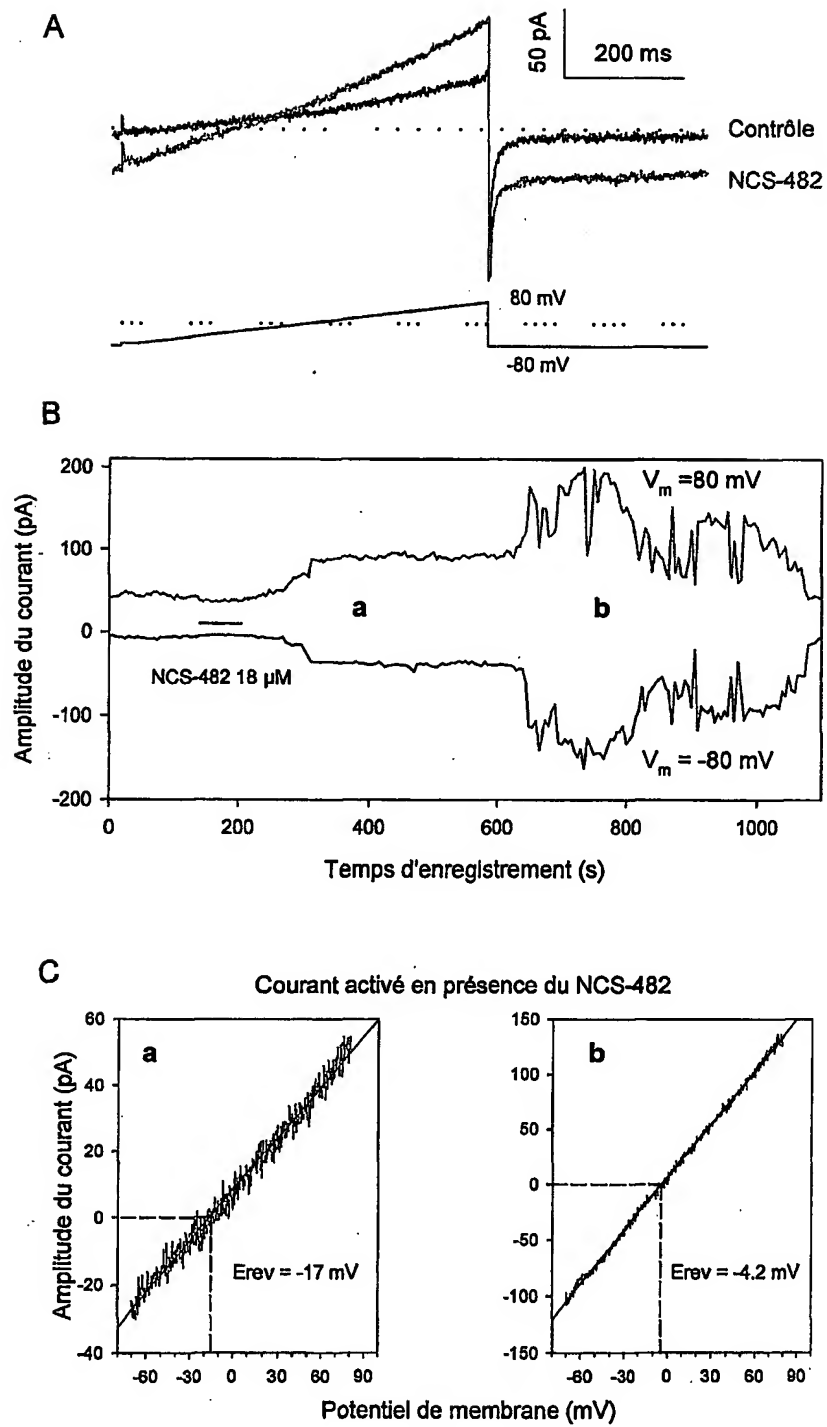


Figure 26.

17/25

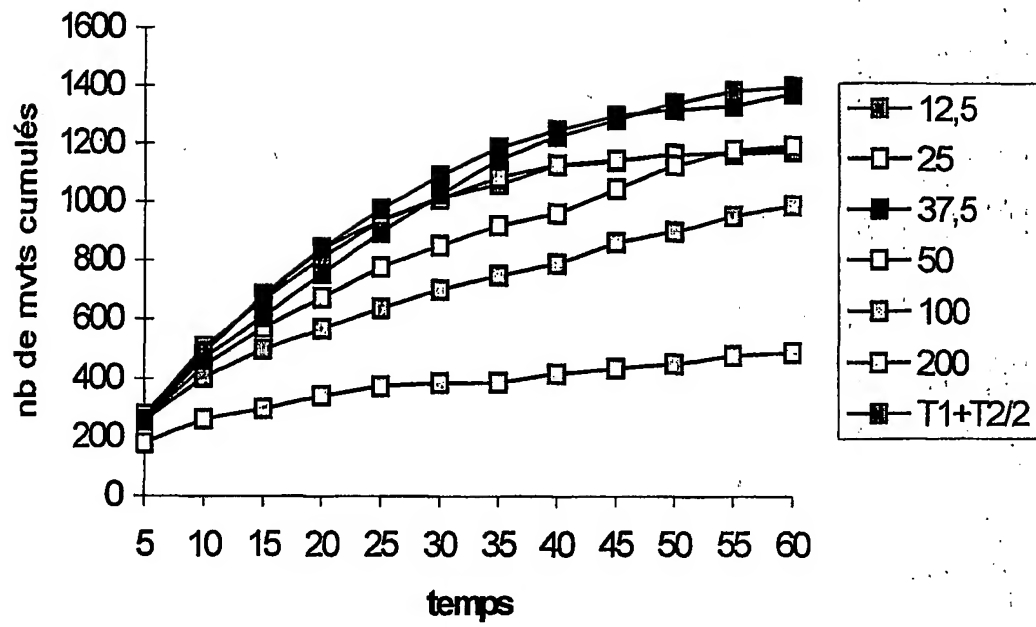


Figure 27

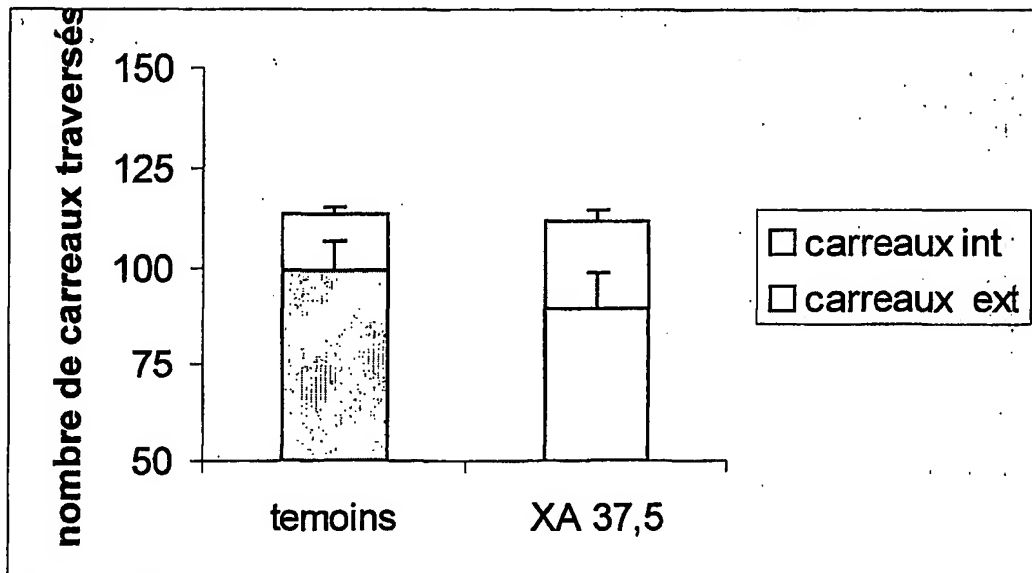


Figure 28

18/25

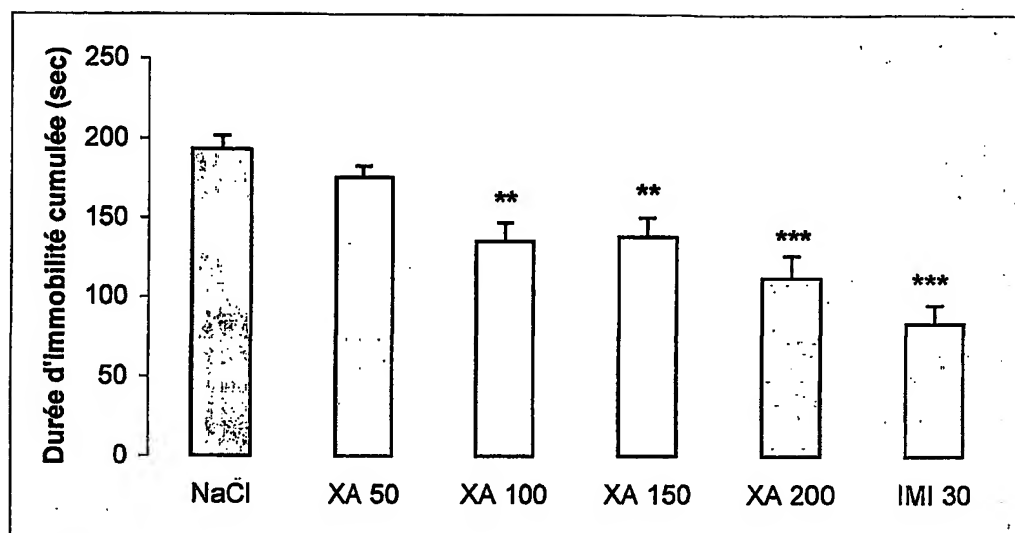


Figure 29

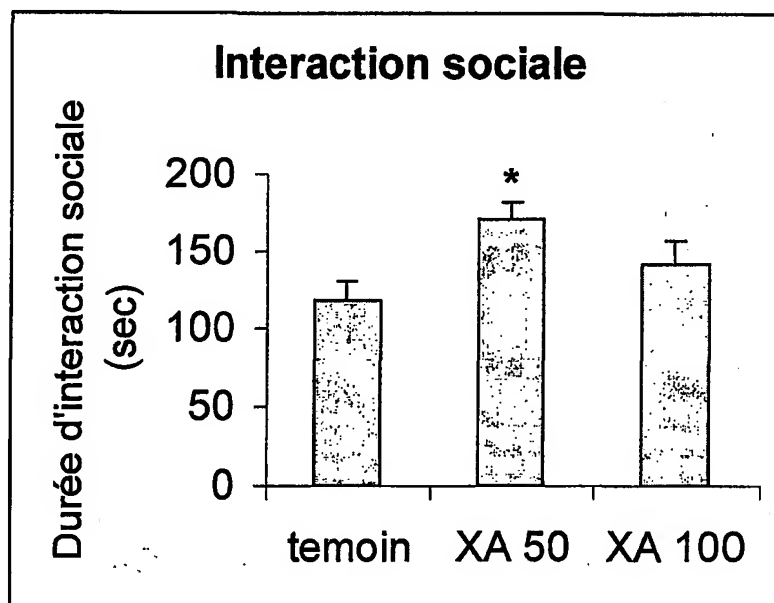
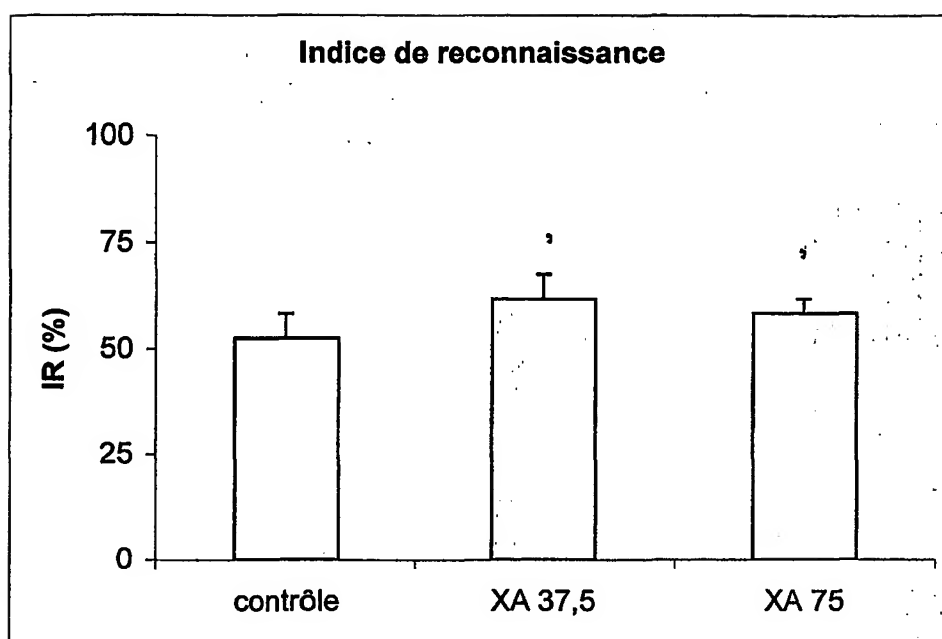
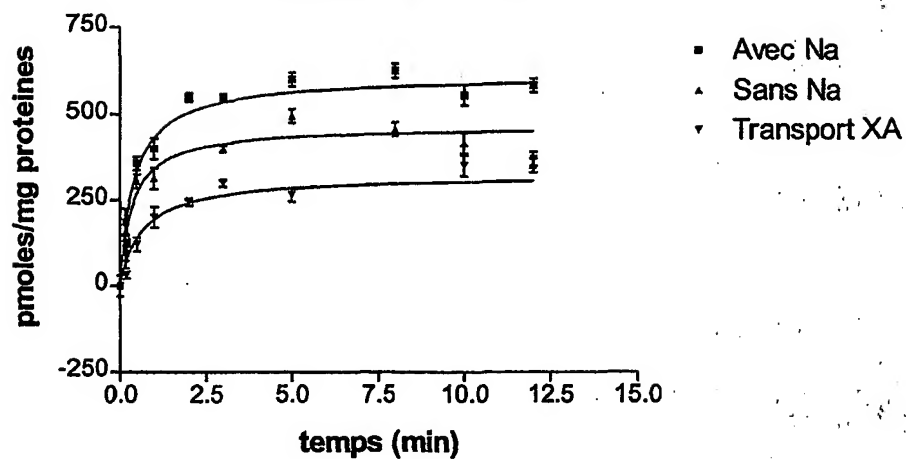
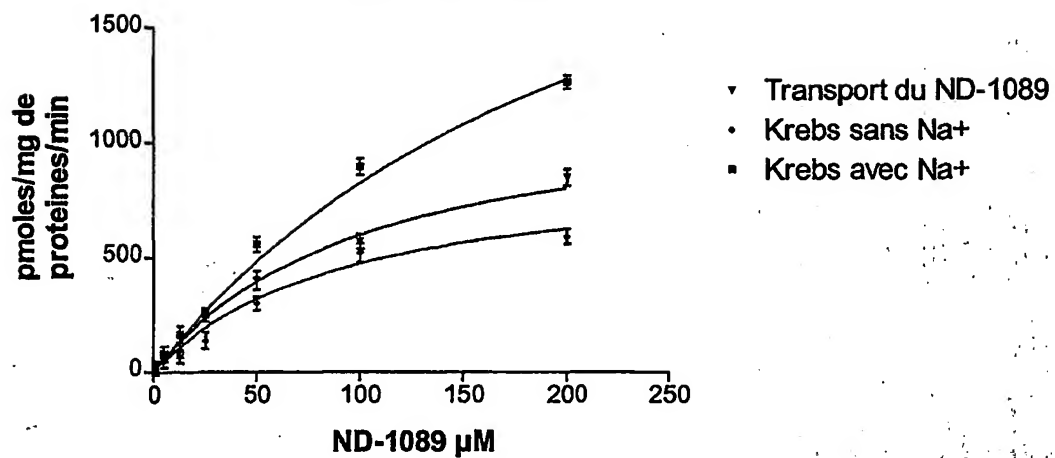


FIGURE 30

19/25

**Figure 31**

20/25

**Transport ND-1089****Figure 32****Transport ND-1089****Figure 33**

21/25

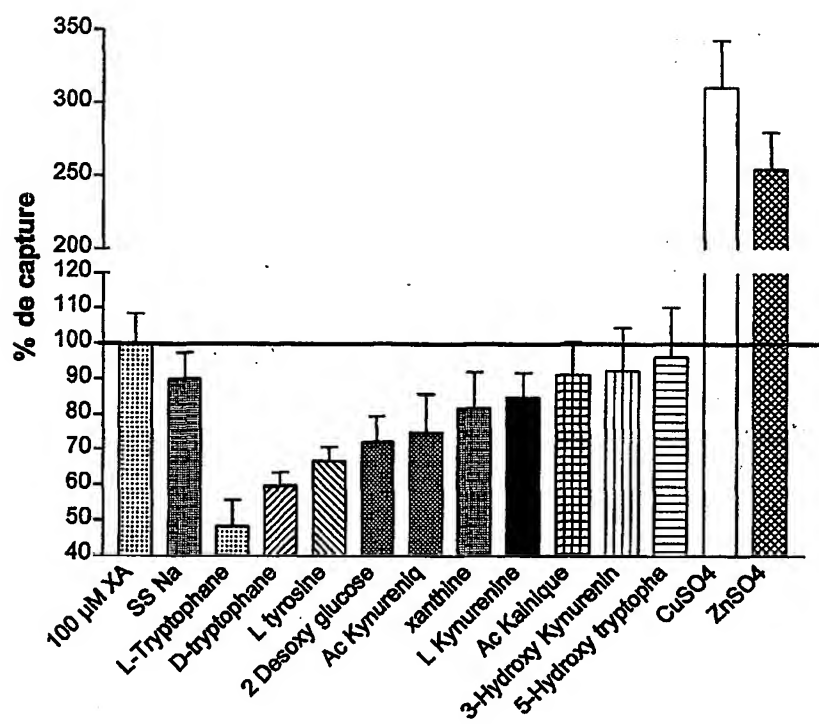
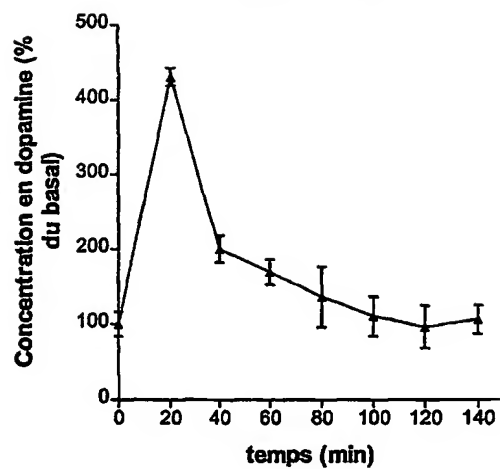
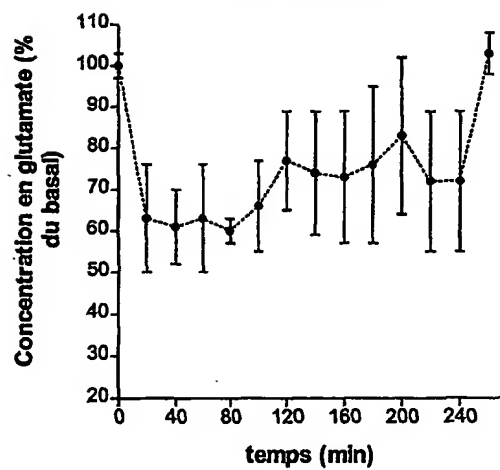


Figure 34

22/25

**DOPAMINE****Figure 35****GLUTAMATE****Figure 36**

23/25

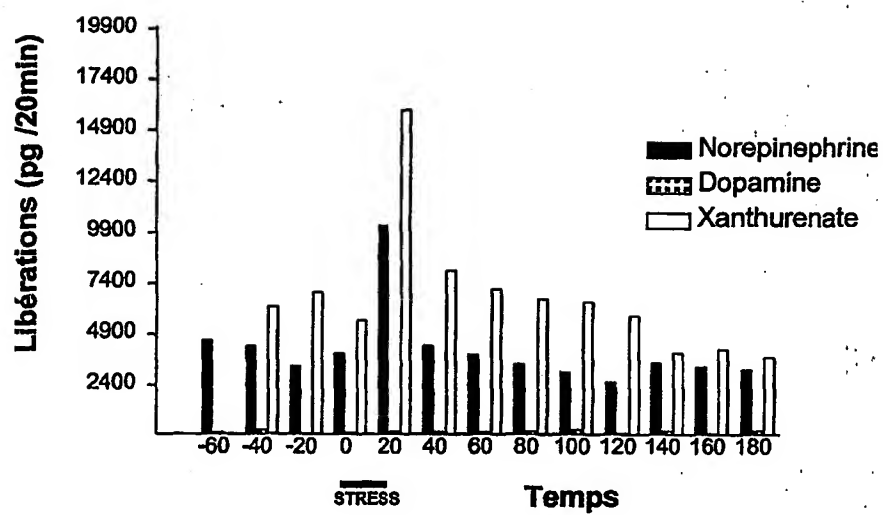


Figure 37

24/25

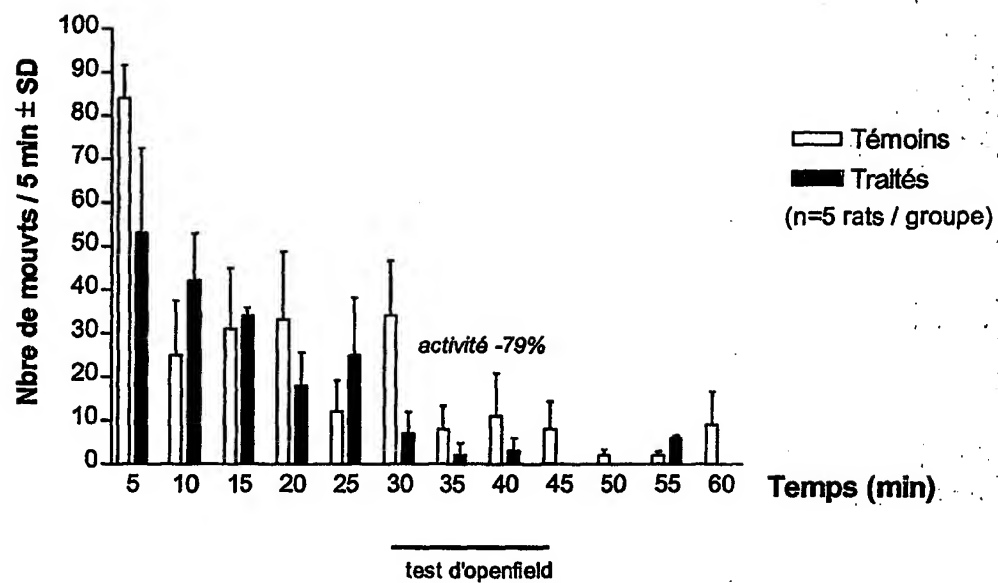


Figure 38

25/25

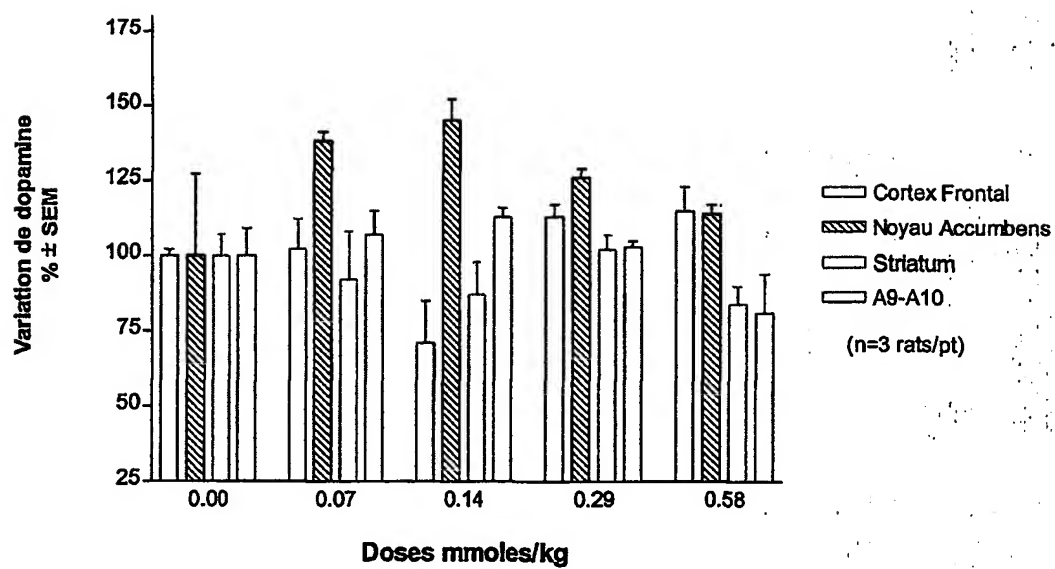


Figure 39

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02337

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68 G01N33/50 G01N33/94

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, COMPENDEX, INSPEC

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 03271 A (PHARMACIA SPA) 2 February 1995 (1995-02-02) abstract claims 1-5,11 page 23, line 15 -page 25, line 14	1,3,5,8, 10-20
X	WO 98 02553 A (BENATTI LUCA ;CINI MASSIMO (IT); COVINI NEVIE (IT); MAGAGNIN SIMON) 22 January 1998 (1998-01-22) example 3B	1,3,5,8, 10-20
X	WO 98 51290 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL ;CHILDRENS MEDICAL CENTER (US)) 19 November 1998 (1998-11-19) example 5	14-20
	---	
	---/---	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the International filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

27 November 2002

Date of mailing of the International search report

05/12/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tuytman, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 02/02337

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MILLER DAVID W ET AL: "Role of high-affinity dopamine uptake and impulse activity in the appearance of extracellular dopamine in striatum after administration of exogenous L-DOPA: Studies in intact and 6-hydroxydopamine-treated rats." JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 72, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 1516-1522, XP008003959 ISSN: 0022-3042 abstract	14-20
A	WO 00 73788 A (MERCK FROSST CANADA INC ;NEIL GARY O (CA); NG GORDON (CA)) 7 December 2000 (2000-12-07) page 16, line 15 -page 26, line 23	1-20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 02/02337

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## Suite du cadre I.2

Les revendications 14-20 présentes ont trait à des composés définis en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir de moduler l'activité de l'acide xanthurénique.

Les revendications couvrent tous les composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de ces composés.

Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les composés suivants décrits dans la description comme modulateur de l'activité de l'acide xanthurénique: tétrodoxine (page 27), les ions potassium et la vératrine (page 26). Les agonistes NCS-482, ND-1301 et l'antagoniste NCS-486 et le composé ND-7000 n'ont pas été recherchés, étant donné que leur dénominations ne sont pas généralement connues dans le domaine scientifique et que par conséquent il n'est pas clair de quels composés il s'agit.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/02337

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9503271	A	02-02-1995	IT 1265101 B1	30-10-1996
			AT 171935 T	15-10-1998
			AU 678273 B2	22-05-1997
			AU 7228594 A	20-02-1995
			CA 2144521 A1	02-02-1995
			CN 1112786 A	29-11-1995
			DE 69413789 D1	12-11-1998
			DE 69413789 T2	06-05-1999
			DK 662948 T3	21-06-1999
			WO 9503271 A1	02-02-1995
			EP 0662948 A1	19-07-1995
			ES 2123801 T3	16-01-1999
			FI 951298 A	20-03-1995
			HU 70478 A2	30-10-1995
			IL 110365 A	15-06-1998
			JP 8501805 T	27-02-1996
			NO 951100 A	22-03-1995
			NZ 268896 A	29-01-1997
			PL 308142 A1	24-07-1995
			RU 2139850 C1	20-10-1999
			SI 662948 T1	28-02-1999
			US 2001008947 A1	19-07-2001
			ZA 9405425 A	01-03-1995
WO 9802553	A	22-01-1998	AU 3443397 A	09-02-1998
			CA 2257383 A1	22-01-1998
			WO 9802553 A1	22-01-1998
			EP 0935661 A1	18-08-1999
			JP 2000516451 T	12-12-2000
			US 6107069 A	22-08-2000
			ZA 9706182 A	03-02-1998
WO 9851290	A	19-11-1998	AU 7389098 A	08-12-1998
			US 6326020 B1	04-12-2001
			WO 9851290 A2	19-11-1998
WO 0073788	A	07-12-2000	AU 4907300 A	18-12-2000
			WO 0073788 A1	07-12-2000
			EP 1188056 A1	20-03-2002

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 02/02337

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 G01N33/68 G01N33/50 G01N33/94

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, MEDLINE, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, COMPENDEX, INSPEC

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95 03271 A (PHARMACIA SPA) 2 février 1995 (1995-02-02) abrégé revendications 1-5,11 page 23, ligne 15 -page 25, ligne 14	1,3,5,8, 10-20
X	WO 98 02553 A (BENATTI LUCA ;CINI MASSIMO (IT); COVINI NEVIE (IT); MAGAGNIN SIMON) 22 janvier 1998 (1998-01-22) exemple 3B	1,3,5,8, 10-20
X	WO 98 51290 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL ;CHILDRENS MEDICAL CENTER (US)) 19 novembre 1998 (1998-11-19) exemple 5	14-20
	-/-	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## ° Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 novembre 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

05/12/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Tuyman, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Recherche internationale No  
PCT/FR 02/02337

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MILLER DAVID W ET AL: "Role of high-affinity dopamine uptake and impulse activity in the appearance of extracellular dopamine in striatum after administration of exogenous L-DOPA: Studies in intact and 6-hydroxydopamine-treated rats." JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 72, no. 4, avril 1999 (1999-04), pages 1516-1522, XP008003959 ISSN: 0022-3042 abrégé	14-20
A	WO 00 73788 A (MERCK FROSST CANADA INC ; NEIL GARY O (CA); NG GORDON (CA)) 7 décembre 2000 (2000-12-07) page 16, ligne 15 -page 26, ligne 23	1-20

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

demande internationale n°  
PCT/FR 02/02337

**Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

## Suite du cadre I.2

Les revendications 14-20 présentes ont trait à des composés définis en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir de moduler l'activité de l'acide xanthurénique.

Les revendications couvrent tous les composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de ces composés.

Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les composés suivants décrits dans la description comme modulateur de l'activité de l'acide xanthurénique: tétrodoxine (page 27), les ions potassium et la vératrine (page 26). Les agonistes NCS-482, ND-1301 et l'antagoniste NCS-486 et le composé ND-7000 n'ont pas été recherchés, étant donné que leur dénominations ne sont pas généralement connues dans le domaine scientifique et que par conséquent il n'est pas clair de quels composés il s'agit.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements rela

x membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 02/02337

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9503271	A	02-02-1995	IT 1265101 B1 AT 171935 T AU 678273 B2 AU 7228594 A CA 2144521 A1 CN 1112786 A DE 69413789 D1 DE 69413789 T2 DK 662948 T3 WO 9503271 A1 EP 0662948 A1 ES 2123801 T3 FI 951298 A HU 70478 A2 IL 110365 A JP 8501805 T NO 951100 A NZ 268896 A PL 308142 A1 RU 2139850 C1 SI 662948 T1 US 2001008947 A1 ZA 9405425 A	30-10-1996 15-10-1998 22-05-1997 20-02-1995 02-02-1995 29-11-1995 12-11-1998 06-05-1999 21-06-1999 02-02-1995 19-07-1995 16-01-1999 20-03-1995 30-10-1995 15-06-1998 27-02-1996 22-03-1995 29-01-1997 24-07-1995 20-10-1999 28-02-1999 19-07-2001 01-03-1995
WO 9802553	A	22-01-1998	AU 3443397 A CA 2257383 A1 WO 9802553 A1 EP 0935661 A1 JP 2000516451 T US 6107069 A ZA 9706182 A	09-02-1998 22-01-1998 22-01-1998 18-08-1999 12-12-2000 22-08-2000 03-02-1998
WO 9851290	A	19-11-1998	AU 7389098 A US 6326020 B1 WO 9851290 A2	08-12-1998 04-12-2001 19-11-1998
WO 0073788	A	07-12-2000	AU 4907300 A WO 0073788 A1 EP 1188056 A1	18-12-2000 07-12-2000 20-03-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**